

Universidad de Málaga

Facultad de Medicina

Biomedicina, Investigación Traslacional y Nuevas Tecnologías en Salud



TESIS DOCTORAL

Estudios ómicos de la respuesta de tolerancia inducida tras inmunoterapia específica de alérgeno en un modelo de anafilaxia a melocotón

Rafael Núñez Serrano

Directora

Cristobalina Mayorga
Mayorga

Directora

Francisca Gómez Pérez

Tutora

María José Torres Jaén


Málaga, 2024





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Rafael Núñez Serrano

 <https://orcid.org/0000-0002-4872-1881>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña RAFAEL NÚÑEZ SERRANO

Estudiante del programa de doctorado BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL, Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: ESTUDIOS ÓMICOS DE LA RESPUESTA DE TOLERANCIA INDUCIDA TRAS INMUNOTERAPIA ESPECÍFICA DE ALÉRGENO EN UN MODELO DE ANAFILAXIA A MELOCOTÓN.

Realizada bajo la tutorización de MARÍA JOSÉ TORRES JAÉN y dirección de CRISTOBALINA MAYORGA MAYORGA Y FRANCISCA GÓMEZ PÉREZ (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 22 de ENERO de 2024

Fdo.: RAFAEL NÚÑEZ SERRANO Doctorando/a	Fdo.: MARÍA JOSÉ TORRES JAÉN Tutor/a





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Escuela de Doctorado

Fdo.: CRISTOBALINA MAYORGA MAYORGA Y FRANCISCA GÓMEZ PÉREZ
Director/es de tesis

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



EFQM AENOR



Edificio Pabellón de Gobierno. Campus El Ejido.
29071
Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 61 / 952 13 71 10
E-mail: doctorado@uma.es

D. / D^a María José Torres Jaén,

Catedrático/a del departamento de Medicina y Dermatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga

D. / D^a Cristobalina Mayorga Mayorga,

Investigador/a Nicolas Monarde en el Área de Alergia del Hospital Regional Universitario de Málaga

D. / D^a Francisca Gómez Pérez,

Facultativo especialista de Área de Alergia Del Hospital Regional Universitario de Málaga

CERTIFICA/N Que D/D^a Rafael Núñez Serrano

ha obtenido y estudiado personalmente bajo mi dirección los datos clínicos necesarios para la realización de su Tesis Doctoral, titulada: "Estudios ómicos de la respuesta de tolerancia inducida tras inmunoterapia específica de alérgeno en un modelo de anafilaxia a melocotón" que considero tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al superior juicio de la Comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar a grado de Doctor.

Y que la publicación/es en coautoría que avala la presentación de esta tesis y cuya referencia/s es/son:

1. Núñez, R., et al. Transcriptional changes in dendritic cells underlying allergen specific induced tolerance in a mouse model. *Sci Rep* 12, 2797 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06186-8>
2. Núñez, R. et al. Methylation changes induced by a glycodendropeptide immunotherapy and associated to tolerance in mice. *Frontiers in Immunology* 13, (2022). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1094172>
3. Núñez, R. et al. A synthetic glycodendropeptide induces methylation changes on regulatory T cells linked to tolerant responses in anaphylactic-mice. *Frontiers in Immunology* 14, (2023). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1165852>

no ha/han sido utilizada/s en tesis anteriores ni en la Universidad de Málaga ni en otras Universidades.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente certificado en Málaga 22 de enero 2024.

Firman todos

Director/es

Director/a: Cristobalina Mayorga Mayorga

Director/a: Francisca Gómez Pérez

Tutor/a: María José Torres Jaén



Yo, **Rafael Núñez Serrano**, declaro que soy autor del presente trabajo de investigación cuyo título es **“Estudios ómicos de la respuesta de tolerancia inducida tras inmunoterapia específica de alérgeno en un modelo de anafilaxia a melocotón”**, que ha sido realizado bajo la dirección de la Dra. Cristobalina Mayorga Mayorga y la Dra. Francisca Gómez Pérez, y bajo la tutela de la Dra. María José Torres Jaén.

Y para que así conste firmo el presente certificado en Málaga a 22 de enero de 2024.

Fdo. Rafael Núñez Serrano



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Los resultados obtenidos en este trabajo han dado lugar a los siguientes artículos científicos y comunicaciones a congresos:

Artículos científicos

1. **Núñez, R.**, *et al.* Transcriptional changes in dendritic cells underlying allergen specific induced tolerance in a mouse model. *Sci Rep* **12**, 2797 (2022).
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-06186-8>
2. **Núñez, R.** *et al.* Methylation changes induced by a glycodendropeptide immunotherapy and associated to tolerance in mice. *Frontiers in Immunology* **13**, (2022). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1094172>
3. **Núñez, R.** *et al.* A synthetic glycodendropeptide induces methylation changes on regulatory T cells linked to tolerant responses in anaphylactic-mice. *Frontiers in Immunology* **14**, (2023). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1165852>

Comunicaciones a congresos

1. María Rodríguez-Sánchez, **Rafael Núñez**, James Perkins, Alba Rodríguez-Nogales, Ana Molina Bueno, María Francisca Palomares Jerez, Francisco Rojo, María Torres Jaén, Cristobalina Mayorga. Allergen specific immunotherapy leads to multiple transcriptional changes in a peach allergy mouse model. 2020 AAAAI virtual annual meeting. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.12.197>



2. José Cañas, **Rafael Núñez**, María Rodríguez, Francisca Palomares, Marís del Carmen Martín-Astorga, Clara Lebrón-Martín, Ana Molina Bueno, Juan París, Anyith Cruz-Amaya, María Torres, Cristobalina Mayorga. Sublingual Immunotherapy With A Synthetic Dendrimeric Pru p 3 Nanosystem Induces Changes In DNA Methylation In Allergic Mice. 2023 AAAI annual meeting. 20-24 de febrero. San Antonio, Texas, USA. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.12.090>
3. José Antonio Cañas, **Rafael Núñez**, *et al.* A synthetic dendrimeric Pru p 3 nanosystem induces changes in mice suggesting tolerance or desensitisation. 2023 Immunology Winter School (EAACI). O07. 26-29 de enero. Davos, Switzerland.
4. **Rafael Núñez**, José Antonio Cañas, María José Rodríguez, Juan Luis París, Clara Lebrón-Martín, María del Carmen Martín-Astorga, Carlos José Aranda, Ana Molina, Anyith Cruz-Amaya, María José Torres, Cristobalina Mayorga. Induced methylation changes by sublingual immunotherapy with a dendrimeric Pru p 3 glycodendropeptide in anaphylactic mice. 2023 EAACI Hybrid Congress. 9-11 de junio. Hamburg, Germany.



Esta tesis de doctoral se ha financiado con los proyectos que se incluyen a continuación.

Proyectos

- Proyecto Estratégico de la Junta de Andalucía PE-0039-2018 “Intervención con prebióticos para el tratamiento de la alergia a alimentos”.
- Proyecto de Investigación del Instituto Carlos III PI17/01318 “Identificación de biomarcadores de utilidad diagnóstica en pacientes con alergia a LTP de fenotipo grave. Mecanismos implicados en la inmunoterapia con LTP”
- Proyecto de Investigación del Instituto Carlos III PI18/00288 “Biomarcadores inmunológicos y epigenéticos de tolerancia a alérgenos alimentarios inducidos por inmunoterapia basada en nanoestructuras oligodendroméricas y epítomos T”.
- Proyecto de Investigación del Instituto Carlos III PI21/00346 “*Microneedles and nanoparticles as innovative strategy for epicutoaneous immunotherapy administration in allergic diseases. Identification of biomarkers of long-lasting tolerance*”.





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

En primer lugar, quiero dar las gracias a todos los compañeros del laboratorio, porque sus esfuerzos han hecho posible este estudio, ya sea por su aportación en el mismo, indispensable en lo técnico y en lo humano, o por facilitarme el día a día con un trabajo invisible aquí.

También me gustaría agradecer a las directoras de esta tesis doctoral, Paqui y Lina, por confiar en mí para realizar este estudio y por ayudarme a crecer y mejorar como investigador. En especial, me gustaría poner en valor el respeto y consideración que siempre han demostrado por mis aportaciones y mi trabajo. Gracias también a Pepa, por participar como tutora de esta tesis y por permitirme colaborar en otros proyectos que han enriquecido mi experiencia durante estos años.

Doy gracias a los míos. Muertos y vivos. De sangre o adquiridos. El orgullo que sentís por mis logros nunca será suficiente para pagar ni los esfuerzos ni los sacrificios, y mucho menos el amor y el apoyo que me habéis regalado para alcanzarlos. Por tanto, os brindo esta tesis doctoral, vuestro es el talento, vuestros son sus frutos.

No quiero terminar sin acordarme explícitamente de algunos de vosotros. Doy gracias a mis suegros, a mis padres, a mi esposa, a mis hijos, a Dios.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ABREVIATURAS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AA: Alergia a alimentos.

AID: del inglés *activation induced deaminase*.

AIT: del inglés *allergen-specific immunotherapy*.

APC: del inglés *antigen presenting cell*.

BCR: del inglés *B cell receptor*.

Breg: células B reguladoras.

CD4: clúster de diferenciación 4.

CD23: clúster de diferenciación 23.

CD25: clúster de diferenciación 25.

CD28: clúster de diferenciación 28.

CD40: clúster de diferenciación 40.

CD80: clúster de diferenciación 80.

CD81: clúster de diferenciación 81.

CD86: clúster de diferenciación 86.

CD152: clúster de diferenciación 152.

CLR: del inglés *C-lectin receptor*.

CTLA4: del inglés *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*.

DAMPs: del inglés *damage-associated molecular patterns*.

DC-SIGN: inglés *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*.

DEGs: del inglés *differentially expressed genes*.

DMPRs: del inglés *differentially methylated promoter regions*.

EAACI: del inglés *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*.

EPIT: del inglés *epicutaneous immunotherapy*.

FcεRI: receptor de alta afinidad de la IgE.

FcεRII: receptor de baja afinidad de la IgE.

GALT: del inglés *Gut-associated lymphoid tissue*.

GDP: glicodendropéptido.

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

ICOS: co-estimulador inducible de células T.

IgE: Inmunoglobulina de tipo E.

IgEe: Inmunoglobulina de tipo E específica.

IgG: Inmunoglobulina de tipo G.

IgM: Inmunoglobulina de tipo M.

IL: interleuquina.

IL-2R: receptor de la IL-2.

IL-10R: receptor de la IL-10

IL4ra: receptor alfa de la IL-4.

ILC2: Del inglés *innate lymphoid cell type 2*.

ILC3: Del inglés *innate lymphoid cell type 3*.

LTP: del inglés *lipid transfer protein*.

MCT: del inglés *microcrystalline tyrosine*.

MHC-II: complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II.

NGS: del inglés *next generation sequencing*.

NLM: nódulo linfático mesentérico.

OIT: del inglés *oral immunotherapy*.

PAMPs: Del inglés *pathogen-associated molecular patterns*.

PD-1: Del inglés *programmed death 1*.

PD-L1: Del inglés *programmed death ligand 1*.

RNA-seq: del inglés *RNA sequencing*.

SCIT: Del inglés *subcutaneous immunotherapy*.

TCR: del inglés *T cell receptor*.

TGF- β : Del inglés *transforming growth factor beta*.

Th1: T helper 1.

Th2: T helper 2.

TLR: del inglés *toll-like receptor*.

TNF α : Del inglés *tumor necrosis factor alpha*.

Treg: T regulador.

WGBS-seq: del inglés *whole genome bisulphite sequencing*.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

CERTIFICADOS	III
AGRADECIMIENTOS.....	XIII
ABREVIATURAS	XVII
ÍNDICE	25
ÍNDICE DE TABLAS.....	27
ÍNDICE DE FIGURAS	31
RESUMEN.....	35
INTRODUCCIÓN	39
1. Tipos de reacciones adversas a alimentos	43
1.1 Tipos de reacciones inmunes adversas a los alimentos	44
2. Epidemiología y factores de riesgo de la alergia a alimentos	48
3. Fisiopatología de las reacciones alérgicas mediadas por IgE	53
3.1 Rol de la mucosa	53
3.2 Sensibilización	57
3.3 Fase efectora de la respuesta alérgica	63
3.4 Manifestaciones clínicas de la alergia a alimentos mediada por IgE	65
3.5 Características alergénicas de las proteínas de origen vegetal	69
3.5.1 Alérgenos de origen vegetal	71
4. Tolerancia a los alimentos	75
4.1 Tolerancia natural	75
4.1.1 Contexto inmunológico de la tolerancia natural	75
4.1.2 Diferenciación de las células Treg periféricas	77
4.1.3 Mecanismos efectores de las células Treg en la respuesta de tolerancia a los alimentos	80
4.1.4 Subpoblaciones de células Treg en la respuesta tolerante	82
4.2 Tolerancia inducida	85



4.2.1 Inmunoterapia específica de alérgeno en alergia a alimentos vegetales	86
4.2.2 Innovaciones terapéuticas	90
4.3 Modelos animales de tolerancia inducida	95
4.3.1 Inmunoterapia sublingual basada en glicodendropéptidos en un modelo murino de anafilaxia a melocotón	96
5. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en el estudio de las alergias a alimentos	99
JUSTIFICACIÓN	101
OBJETIVOS.....	105
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	109
1. Mecanismos propios de las células dendríticas regulados por la SLIT con D1ManPrup3	115
A. Estudio de la expresión diferencial	115
B. Estudio de la metilación diferencial en regiones promotoras	120
2. Mecanismos propios de las células Treg regulados por la SLIT con D1ManPrup3	127
A. Estudio de la metilación diferencial en regiones promotoras	127
3. Discusión final	133
CONCLUSIONES	135
REFERENCIAS.....	139
ANEXOS	169
1. Artículo 1	171
2. Artículo 2	175
3. Artículo 3	179
4. Comunicaciones a congresos	183

ÍNDICE DE TABLAS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Tabla 1 - Grados de gravedad de la anafilaxia según la organización mundial de la alergia.

Tabla 2 - Clasificación de los alérgenos vegetales más importantes.

Tabla 3 - Grupos experimentales del estudio.

Tabla 4 - Tabla resumen de la expresión diferencial.

Tabla 5 - Tabla resumen de la metilación diferencial en regiones promotoras.

Tabla 6 - Tabla resumen de la metilación diferencial en regiones promotoras.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE DE FIGURAS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Figura 1. Clasificación de las reacciones adversas a los alimentos.

Figura 2. Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad.

Figura 3. Frecuencias de los distintos alérgenos alimentarios en la población española.

Figura 4. Mecanismos inmunológicos involucrados en la sensibilización a los alérgenos alimentarios.

Figura 5. Resumen de los mecanismos inmunológicos involucrados en la fase efectora.

Figura 6. Distribución por el organismo de las manifestaciones clínicas características de las reacciones alérgicas a los alimentos mediadas por IgE.

Figura 7. Esquema del establecimiento de la tolerancia a un alérgeno alimentario en el intestino delgado.

Figura 8. Esquema de los mecanismos efectores y las subpoblaciones de Tregs encargadas de mantener la tolerancia periférica.

Figura 9. Composición, vías de aplicación y mecanismos moleculares de la AIT.

Figura 10. Diseño de la inmunoterapia en un modelo de anafilaxia y de los estudios de secuenciación masiva.

Figura 11. Gráficos de volcán para los tres análisis de expresión diferencial.

Figura 12. Diagrama de Venn para las listas de genes expresados diferencialmente obtenidas en el estudio.

Figura 13. Diagramas de Venn para las listas de DMPRs hipometiladas e hipermetiladas detectadas en los grupos Tolerante y Desensibilizado.

Figura 14. Diagramas de Venn para las listas de DMPRs detectas en el estudio.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

RESUMEN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

En la actualidad la alergia a alimentos es una patología en auge, un 3,28% de la población adulta española es alérgica a algún alimento, la mayor parte a alimentos de origen vegetal. De entre los alérgenos de origen vegetal destacan las proteínas de transferencia de lípidos (LTPs) como los agentes causantes más frecuentes en el área mediterránea; siendo Pru p 3, el alérgeno mayor del melocotón, la LTP con mayor prevalencia. Reducir el manejo de la alergia a LTPs únicamente a la evitación puede ser problemático, porque es frecuente encontrar pacientes que padecen síndrome LTP, el cual afecta a la calidad de vida de los pacientes al incrementar el número de exposiciones accidentales debido a las características panalérgicas de estas proteínas. Por esto, la inducción de tolerancia mediante inmunoterapia alérgeno-específica es la única alternativa de tratamiento segura y efectiva; estudios previos han probado que la inmunoterapia alérgeno-específica puede incrementar la tolerancia tanto en pacientes como en un modelo murino de anafilaxia a melocotón. Sin embargo, existen limitaciones en la efectividad a largo plazo. Por tanto, es necesario estudiar los mecanismos inmunitarios, celulares y moleculares que subyacen a la tolerancia inducida, para establecer nuevos biomarcadores pronósticos de respuesta al tratamiento. Esta tesis doctoral se ha desarrollado entorno a un modelo animal de inmunoterapia sublingual para melocotón, que consigue producir tanto fenotipos tolerantes a largo plazo como desensibilizados transitoriamente, lo que ha permitido conducir nuevas investigaciones exploratorias que arrojan luz sobre algunas cuestiones que rodean a la diversidad de respuestas a un mismo tratamiento inmunomodulador.

En esta tesis doctoral se han conducido tres experimentos de secuenciación masiva. El primero estudió los cambios de expresión génica manifestados por las células dendríticas de ganglios linfáticos tras la inmunoterapia, hallándose un panorama transcripcional específico del tratamiento y por tanto de la protección frente a Pru p 3 a largo plazo. Las células dendríticas de los animales tolerantes mostraron expresión diferencial en genes que inducen la actividad tolerogénica y promueven la respuesta



reguladora de las células T. Mientras que en los animales desensibilizados se encontró expresión diferencial en genes relacionados con los procesos proinflamatorios que menoscaban la protección a melocotón. Los otros dos experimentos de secuenciación estudiaron los cambios epigenéticos surgidos tras la inmunoterapia en las células dendríticas y en las células T reguladoras, estos cambios se originaron también de un modo tratamiento-dependiente, y por lo tanto se asociaron también a los fenotipos tolerante o desensibilizado. En las células dendríticas se observaron diferencias significativas de metilación en los promotores de múltiples genes expresados diferencialmente, y que se relacionan con los mecanismos tolerogénicos o desensibilizantes. Por último, se hallaron diferencias significativas de metilación en diversos factores de transcripción, p.e. GATA-3 y FoxP3, esenciales para la estabilidad y función de las células T reguladoras. Estos resultados permiten proponer diversos biomarcadores pronósticos de respuesta a la inmunoterapia, que pueden aplicarse a nivel de expresión, tanto en ARN como en proteína, como a nivel epigenético.

INTRODUCCIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

La alergia se define como una condición no esporádica en la que el individuo experimenta una reacción inmunológica anormal tras la exposición a una sustancia inocua denominada alérgeno, por consiguiente, la etiología de esta enfermedad se considera condicionada por la naturaleza del individuo y su contexto ambiental¹. El término alergia no se acuñó ni delimitó fisiopatológicamente hasta inicios del siglo XX, pese a esto, no era un fenómeno de aparición reciente. Existen múltiples testimonios historiográficos que discurren desde el antiguo Egipto de los faraones hasta la Edad contemporánea, pasando por la Roma imperial, la Grecia clásica o Al-Ándalus, y que atestiguan la presencia de esta patología en todos los periodos de la historia. No obstante, no existían las condiciones materiales o intelectuales adecuadas que permitieran el reconocimiento de la etiología y la definición terminológica de la alergia. Fue finalmente gracias a los descubrimientos científicos alcanzados durante el siglo XIX por científicos como Paul Ehrlich o Charles H. Blackley, cuando en 1906 Clemens Vons Pirquet presentó en Viena un concepto innovador, alergia, conformado por los vocablos griegos “allos” (otro) y “ergon” (respuesta), que se extendió rápidamente por todo el mundo y se ha conservado hasta la actualidad como nombre preferente para esta entidad patológica². La alergia, por lo tanto, no es un fenómeno nuevo, y tampoco es exclusivo de las poblaciones residentes en el primer mundo, sino una enfermedad de prevalencia ascendente que se ha convertido ya en una de las principales epidemias en sociedades avanzadas, este crecimiento se estima que alcanza hasta el 30% de la población europea³ y a alrededor de 500 millones de personas en el conjunto total de la población mundial⁴. En consecuencia, la alergia es un problema ineludible para los sistemas sanitarios y la industria farmacéutica asociada, por lo que es de vital interés el estudio de los procesos celulares y moleculares que subyacen a esta patología tanto para su diagnóstico como tratamiento.

Tal y como se han definido, las reacciones alérgicas pueden desencadenarse tras la exposición a un alérgeno, que puede tener orígenes muy diversos como pólenes,

esporas, pelaje y caspa, venenos de insectos, fármacos o incluso alimentos. El objeto de esta tesis doctoral es el estudio de aquellas reacciones alérgicas producidas por los alérgenos de origen alimentario.

1. Tipos de reacciones adversas a alimentos

La alergia a alimentos (AA) es aquella reacción inmune adversa reproducible que se desencadena tras la exposición, generalmente por ingesta, a un determinado alimento, entendiendo como tal toda aquella sustancia destinada al consumo humano, sin incluir fármacos, cosméticos y derivados del tabaco⁵. Estas reacciones adversas no deben confundirse con las reacciones no mediadas por el sistema inmune, las cuales se denominan intolerancias alimentarias, siendo un ejemplo clásico la intolerancia al disacárido lactosa. Además, se debe puntualizar que existen reacciones adversas no alérgicas derivadas de la toxicidad propia o adquirida de un alimento, denominadas reacciones tóxicas. En definitiva, en la AA las reacciones son provocadas por alérgenos que pueden proceder de cualquier tipo de alimento incluido en la dieta. No obstante, determinados alimentos se consideran más alergénicos que otros, puesto que se encuentran sobrerrepresentados epidemiológicamente frente a otros alimentos y alguna de sus características fisicoquímicas facilita el desarrollo de la enfermedad. En secciones posteriores se tratará la alergenicidad de determinados alimentos, específicamente de alguno de sus componentes proteicos. Finalmente, en el esquema representado en la Figura 1 se muestra la clasificación de las distintas reacciones adversas a los alimentos según fueron definidas por la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI, por sus siglas en inglés)^{6,7}.

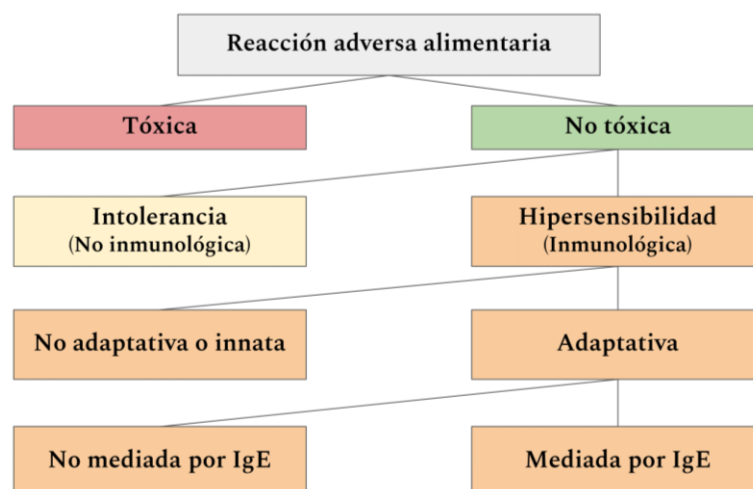


Figura 1. Clasificación de las reacciones adversas a los alimentos.

1.1 Tipos de reacciones inmunes adversas a los alimentos

Anteriormente, se ha establecido como condición necesaria que la reacción adversa a los alérgenos alimentarios sea mediada por el sistema inmune para ser considerada una reacción de hipersensibilidad o alérgica. Y son los mecanismos humorales y celulares de esta reacción inmune los que causan en último lugar el conjunto diverso de manifestaciones clínicas que se asocian a esta patología. Es más, los cuadros clínicos específicos que se observan en la práctica clínica están mediados por mecanismos inmunitarios concretos, por lo que las reacciones alérgicas a alimentos, o a cualquier otro alérgeno, pueden clasificarse en función de los agentes inmunes implicados en el desarrollo de la enfermedad y en su sintomatología. En la década de 1960 se formuló por Gells y Coombs una clasificación que dividía las reacciones de hipersensibilidad perniciosas, en función del mecanismo efector involucrado, en cuatro categorías que se exponen a continuación⁸.

Las reacciones tipo I (Figura 2A) son aquellas en las que se crean inmunoglobulinas de tipo E (IgE) específicas para el alérgeno, que inducen la degranulación de mastocitos y basófilos provocando una reacción que se desencadena en menos de 1 hora, por lo que también se conocen como reacciones inmediatas. Este tipo de reacciones requieren de un proceso de sensibilización que capacite a los linfocitos B para producir IgE específica. Dos ejemplos paradigmáticos de este tipo de reacciones son la anafilaxia y la hiperreactividad bronquial en el asma. Las reacciones de hipersensibilidad de tipo I son predominantes en las alergias a alimentos por lo que es en estos mecanismos donde se va a profundizar en la investigación de este estudio. En la siguiente sección se describe con mayor detalle la cronología, los mecanismos y la resolución de estas reacciones.

Las reacciones de tipo II (Figura 2B) son reacciones mediadas por inmunoglobulinas de tipo G (IgG) e inmunoglobulinas de tipo M (IgM). Estas IgG e IgM

se unen al antígeno que se encuentra adherido a su vez a la superficie de una célula, que típicamente suele ser un eritrocito, un neutrófilo, una plaqueta o una célula epitelial. Induciendo citotoxicidad celular, fagocitosis y activación del sistema del complemento. La activación de estos mecanismos resulta en la destrucción de las células que tienen adherido el antígeno. Este tipo de reacciones se observa en enfermedades como la trombocitopenia o la anemia hemolítica autoinmune.

Las reacciones de tipo III (Figura 2C) son aquellas mediadas por complejos inmunes conformados por la unión de alérgenos e inmunoglobulinas (IgG), que circulan libremente por el torrente sanguíneo hasta que se acumulan en determinados tejidos como por ejemplo los vasos sanguíneos, desembocando finalmente en procesos inflamatorios locales producidos por células como los neutrófilos. Las reacciones de tipo III son características de la artritis reumatoide o el lupus eritematoso.

Finalmente, las reacciones del tipo IV (Figura 2D) son las que se producen por mecanismos mediados por células efectoras, sin la producción de anticuerpos de ningún tipo. En estas reacciones las células T se activan por la interacción con una célula presentadora de antígenos (APC del inglés *antigen presenting cell*) y desencadenan una respuesta inflamatoria que puede ser muy diversa en función del tipo o tipos de células T involucradas, como pueden ser las células T helper 1, células T helper 17 o células T citotóxicas. Además, estas reacciones requieren entre 24-48 horas para desarrollar sus síntomas tras la exposición, y por eso se conocen como retardadas. Un ejemplo típico de las reacciones de tipo IV es la dermatitis por contacto, en la cual se produce una respuesta de tipo T helper 1 que resulta en la activación de los macrófagos. Finalmente son los macrófagos los encargados de la producción de diversas citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 1 (IL-1) y la IL-6, y otras sustancias inflamatorias como componentes del sistema del complemento, especies reactivas de oxígeno o

enzimas lisosómicas, que desencadenan los síntomas propios de la dermatitis por contacto.

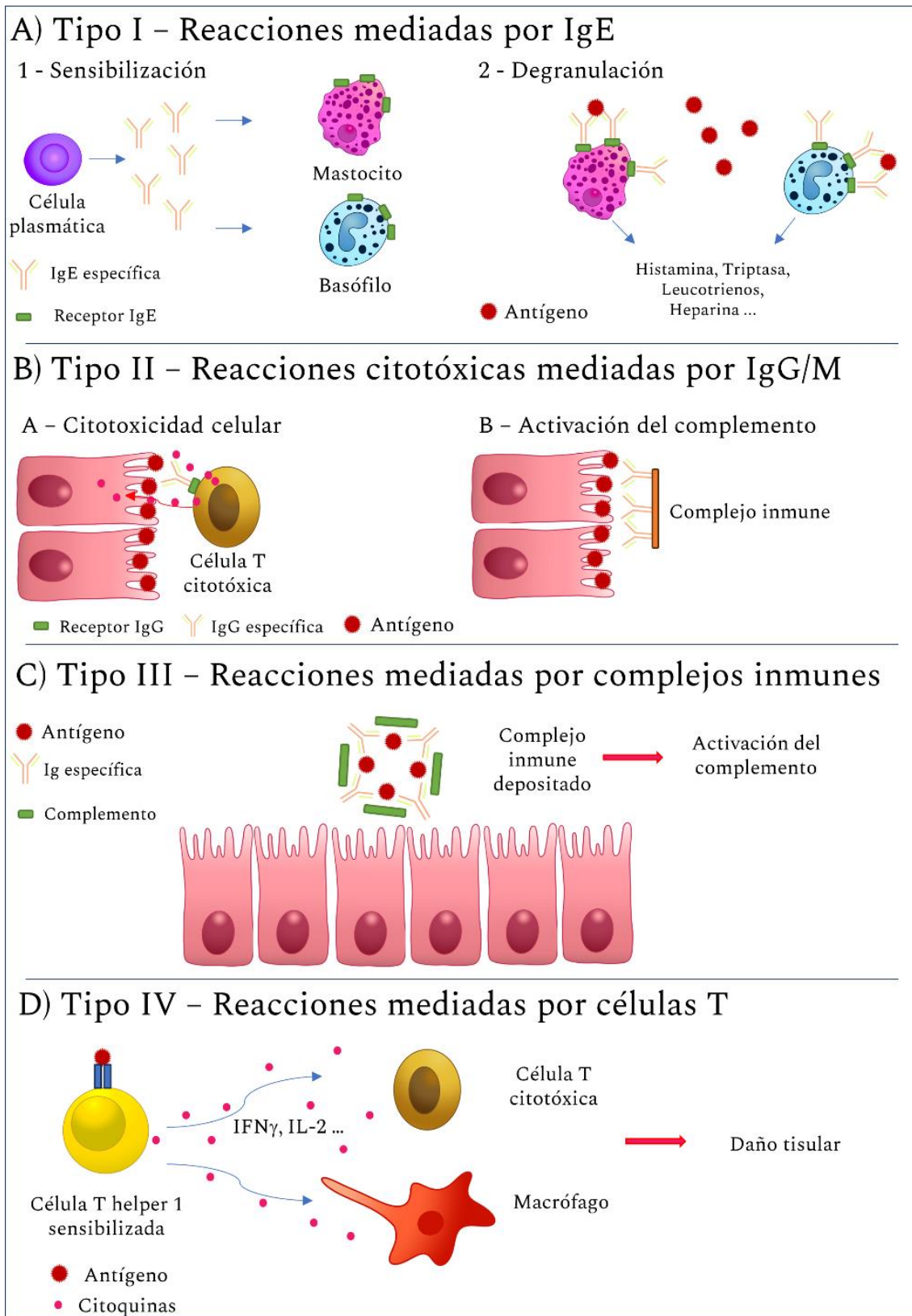


Figura 2 – Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad.

En la actualidad, esta clasificación se puede considerar superada pues existen multitud de subtipos dentro de cada una de las cuatro clasificaciones iniciales, y pueden encontrarse simultáneamente varios mecanismos implicados en una reacción alérgica determinada⁸. No obstante, aunque suponga un enfoque reduccionista, su uso sigue siendo oportuno para entender la naturaleza de las reacciones de hipersensibilidad, ya que por ejemplo determinados alérgenos, por sus características propias como el peso molecular, inducen más un tipo u otro⁸.

2. Epidemiología y factores de riesgo de la alergia a alimentos

La AA no es una excepción dentro de las enfermedades alérgicas, y por lo tanto múltiples estudios atestiguan el crecimiento de su prevalencia a nivel global^{9,10}, acentuándose aún más en las sociedades desarrolladas donde afectan hasta a un 10% de la población¹¹⁻¹³. Esta prevalencia se verá incrementada en los próximos años al no existir aún un tratamiento definitivo y universal para esta enfermedad. Una prueba de este crecimiento podemos encontrarla en el aumento de hasta tres veces de la prevalencia de la alergia a cacahuete en Estados Unidos en los últimos 20 años¹⁴.

Al igual que la prevalencia difiere entre sociedades desarrolladas y en vías de desarrollo, esta también presenta diferencias marcadas en función de la edad, la prevalencia es mayor en la niñez que en la edad adulta; a pesar de que los pacientes adultos pueden padecer una alergia persistente desde la infancia o a partir de una de nueva aparición. Por ejemplo, en Estados Unidos dos estudios realizados entre los años 2015 y 2017 estimaron que la prevalencia de la alergia a alimentos en la infancia se encuentra entre un 5,7% en uno de ellos y un 7,6% en el otro, no obstante, estos estudios están limitados metodológicamente al estar basados únicamente en encuestas^{13,15}. Sin embargo, otros estudios que se apoyan en metodologías más fiables y específicas como son las provocaciones orales o la IgE específica (IgEe) obtuvieron cifras similares de prevalencia infantil. Concretamente, un estudio basado en provocaciones orales conducido en Australia estimó que la AA se manifestaba entre un 5% y un 10% de los niños de etapa preescolar. Otro estudio realizado sobre poblaciones asiáticas, China y Corea, basado en la historia clínica y el estudio de la IgEe, obtuvo una prevalencia aproximadamente del 7% en ese mismo rango de edad^{9,13}.

Mientras tanto, estudios en la población adulta como EuroPrevall encontraron una prevalencia de 0,1-4,1% considerando únicamente a los pacientes adultos confirmados por provocación oral, y de 0,3-5,6% teniendo en cuenta además los casos con

IgEe detectada a algún alimento y los reportados por la historia clínica. Este proyecto además desglosa la información entre distintos países europeos, alcanzando el máximo en Suiza (5,6%) y el mínimo en Grecia (0,3%)¹⁶. En España (Figura 3A) se obtuvo una prevalencia de alergia a cualquier alimento de 3,28%¹⁶. Sin embargo, se debe ser cauto con las prevalencias reportadas en la literatura, ya que generalmente las metodologías aplicadas en los estudios son muy dependientes de la percepción de los propios pacientes y de las definiciones de AA utilizada en cada estudio¹³. Ya se ha observado, en revisiones sistemáticas, una baja correlación entre el reporte de los pacientes y la confirmación por provocación oral¹⁷. Esto evidencia además el reto técnico que supone el diagnóstico de la AA, ya que solo la provocación oral ofrece total garantías. Y esta práctica no está exenta de riesgo y tiene un coste humano relativamente alto, por lo que la indagación en la historia clínica debería ser cumplimentada con la información aportada por técnicas *in vivo*, como los test cutáneos o la medición de la IgEe del alérgeno alimentario¹¹, y de técnicas *in vitro* como el test de activación de basófilos (BAT del inglés *basophil activation test*); una prometedora técnica emergente que permite discriminar individuos tolerantes de alérgicos de un modo más preciso, además de incorporar parámetros que permiten predecir la gravedad de la reacción presentada por los sujetos en el test de provocación oral¹⁸⁻²⁰.

Otro fenómeno epidemiológico que es necesario abordar son los patrones en las frecuencias relativas que presentan los distintos alérgenos alimentarios en función del país, región o cultura gastronómica en la que se estudian²¹. Por ejemplo, en Estados Unidos un grupo de alimentos compuesto por la leche, el huevo, el cacahuete, los frutos secos, la soja, el trigo, el pescado, el marisco y el sésamo causan el 90% de las alergias a alimentos^{16,22,23}. Entre estos, el cacahuete es especialmente importante, y no solo en Estados Unidos, sino también en otros países de la esfera de influencia anglosajona como el Reino Unido o Australia, mientras que, en países del área mediterránea como España o Italia, la alergia al cacahuete presenta una prevalencia significativamente menor. Y a

su vez, en estas regiones se encuentra una prevalencia mayor de otro alérgeno de origen vegetal como es el melocotón^{13,16}. Continuando en el contexto geográfico del sur de Europa, los alérgenos alimentarios más frecuentes tienen origen vegetal (Figura 3).

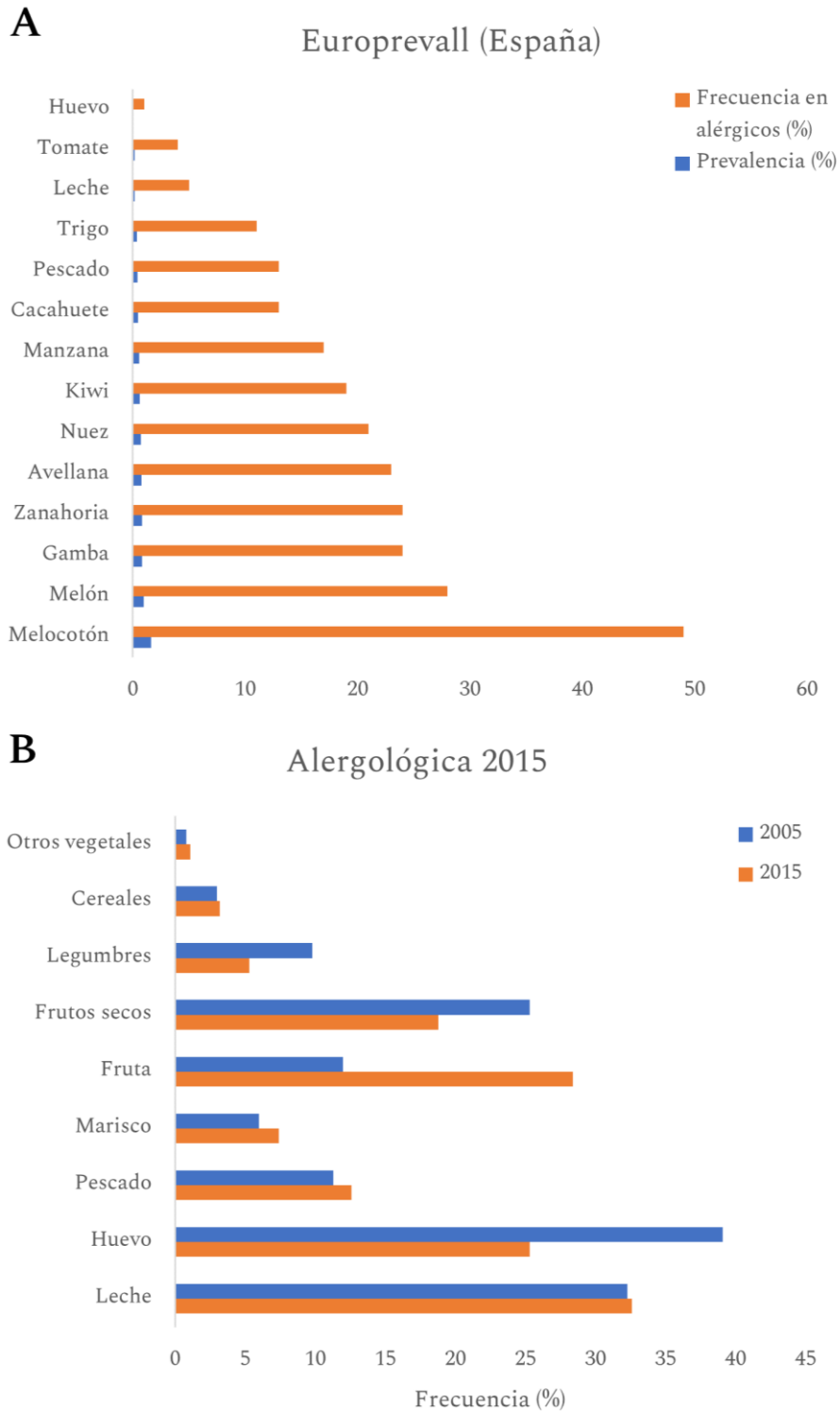


Figura 3 - Frecuencias de los distintos alérgenos alimentarios en la población española. A) Datos extraídos del estudio Europrevall¹⁶. B) Datos extraídos del estudio Alergológica 2015²⁴.

En el caso concreto de España, un estudio conducido en 2015 confirmó esta predominancia de los alérgenos vegetales (Figura 3B), con una subida del 4% con respecto a datos registrados una década antes²⁴. Dentro de la categoría vegetal, las frutas frescas componen aproximadamente el 45% de los causantes de alergia a alimentos, y de entre éstas destacan la familia de las rosáceas, a la que pertenece el melocotón además de otras frutas como la manzana, la pera, la ciruela o la cereza. Concretamente, del melocotón procede el principal alérgeno vegetal implicado en las alergias alimentarias en países como España, Italia y Portugal, la proteína de transferencia lipídica LTP (del inglés *lipid transfer protein*) Pru p 3. Esta LTP se define como alérgeno mayoritario, ya que el 75,6% de los pacientes alérgicos están sensibilizados a esta proteína²⁵.

Desde un punto de vista epidemiológico, una de las razones por las que las alergias alimentarias tienen especial relevancia clínica e incrementan la carga asistencial a los sistemas de salud, es que esta patología está detrás del 81% de los casos de anafilaxia en niños y de entre el 30 y el 50% de los casos en la población general en Norte América, Australia, Europa y Asia²⁶. Y eso es especialmente relevante, porque en los pacientes con reacciones graves, la exposición incluso a cantidades pequeñas del alimento puede producir una reacción fatal. Además, se pueden producir por contaminaciones cruzadas, por contacto con fluidos corporales de otras personas que hayan consumido el alimento e incluso por derivados del cocinado de los alimentos como los humos²⁷. Como resultado se producen al año entre 0,03 y 0,3 muertes por millón de personas en la población general²² de entre las 4-5 reacciones de anafilaxia grave cada 100.000 personas que se desencadenan cada año¹¹.

En esta sección se han descrito una serie de generalidades epidemiológicas sobre la AA que ponen de manifiesto no sólo el carácter epidémico de esta patología, sino que también expone las diferencias que existen en la prevalencia cuando se estratifica la población por edad, lugar de residencia o hábitos alimenticios. Existen por lo tanto cuantiosos factores de riesgo, además de los ya comentados, que influyen en la

probabilidad de padecer AA²⁸, por ejemplo, el género, la deficiencia de vitamina D, la obesidad, o la presencia de determinadas variantes en el genotipo^{29,30}. Otros factores tienen carácter pronóstico, pues permiten estimar la gravedad de las reacciones que se producirán tras la exposición, como por ejemplo el consumo de alcohol, las infecciones virales o el ejercicio físico²². El estudio de estos condicionantes permite abordar la AA desde la medicina preventiva y priorizar la evaluación y tratamiento de aquellos pacientes con alto riesgo de desarrollar reacciones graves como la anafilaxia.

3. Fisiopatología de las reacciones inmediatas o mediadas por IgE

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo I constituyen la inmensa mayoría de las reacciones alérgicas a los alimentos y se caracterizan esencialmente por la producción de IgE específica para el alérgeno, que sensibilizan a las células efectoras, mastocitos y basófilos y que tras una interacción o puenteo con el alérgeno específico se activarán. Estas células degranulan inmediatamente, secretando una serie de mediadores inflamatorios que desencadenan los procesos fisiopatológicos que producen la sintomatología característica de estas reacciones, como son la urticaria, el angioedema o la anafilaxia. En los siguientes apartados se pormenorizan los procesos o fases implicados en el desarrollo de estas reacciones en la alergia a alimentos.

3.1 Rol de la mucosa

En primer lugar, para que puedan actuar los mecanismos efectoras inducidos por la IgE, es necesario que se adquiera la competencia para producir estas inmunoglobulinas, o lo que es lo mismo, se debe producir la pérdida de tolerancia a un alérgeno alimentario. Este proceso se conoce como sensibilización.

La sensibilización en las alergias alimentarias habitualmente da comienzo en el intestino delgado, donde los alimentos ingeridos, y posteriormente digeridos en éste y en los órganos que le preceden en el sistema gastrointestinal, circulan mientras se absorben los nutrientes contenidos en los mismos. Esto último está regulado por la barrera mucosa del tracto gastrointestinal que filtra selectivamente qué elementos pueden pasar eventualmente al torrente sanguíneo, evitando así el paso de sustancias nocivas para el organismo³¹. Por lo tanto, los alérgenos alimentarios deben atravesar el epitelio intestinal y su capa mucosa para que las APC encargadas de iniciar la respuesta inmune los capturen. Sin embargo, hay que señalar que el encuentro entre el alérgeno y las APC puede producirse en otras superficies mucosas del organismo expuestas al

exterior, como son la piel o el tracto respiratorio. No obstante, la sensibilización por las vías epicutánea y nasal se produce por mecanismos análogos, si no idénticos, a los descritos a continuación.

En la barrera mucosa intestinal existen dos vías que posibilitan el contacto entre los alimentos y las APC, y principalmente son la vía del transporte paracelular, es decir por los espacios disponibles entre las células, y la vía del transporte transcelular, que se compone del muestreo y posterior transferencia por las células M (células de micropliegue) y del paso asociado las células cáliz o caliciformes³²⁻³⁴.

El epitelio intestinal está conformado por un mosaico de distintos tipos de células epiteliales, entre los que destacan por importancia los enterocitos absortivos, las células caliciformes, las células M y las células enteroendocrinas, que cooperan para mantener estructural y funcionalmente la barrera mucosa intestinal³⁵. Esto es posible gracias a la unión estrecha entre las células, que define un espacio paracelular dinámico compuesto por tres tipos de complejos de unión: uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas^{35,36}. Los antígenos de origen alimentario pueden alcanzar las APC residentes en la lámina propia mediante la ruta paracelular, pero al contrario que las moléculas hidrosolubles de poco tamaño, los alérgenos requieren de un aumento de la permeabilidad, que puede ocasionarse tras un daño en los complejos de unión. Por ejemplo, las cisteína proteasas provenientes de los alimentos dañan a las ocludinas que forman parte de las uniones estrechas y por tanto debilitan estas uniones permitiendo el paso de macromoléculas e incluso microorganismos, fomentando el desarrollo de la alergia a alimentos³⁷. Este incremento de la permeabilidad también puede observarse después una reducción de la expresión de las proteínas que conforman las uniones estrechas o las uniones adherentes, como la claudina o la E-cadherina, lo cual es característico de los pacientes que padecen enfermedades inflamatorias intestinales³⁸.

La otra vía por la que los antígenos pueden abandonar el lumen intestinal es la vía transcelular, que puede reducirse al paso por las células caliciformes y el paso por las células M, ya que estos dos tipos celulares se asocian íntimamente con el tejido linfoide asociado al intestino (GALT del inglés *gut-associated lymphoid tissue*)³⁹. Las células caliciformes poseen una estructura celular que facilita el paso de los antígenos desde el lumen hacia la lámina propia y que se conoce como pasaje para antígenos asociado a las células caliciformes^{34,35,40}. Este tipo de transporte se ha observado en otros tipos de células epiteliales secretoras, como por ejemplo las células de Paneth³². Interesantemente, la formación de estos pasos puede estimularse por la interleuquina 13 (IL-13), una citoquina característica de las reacciones alérgicas del tipo que nos ocupa³². Además, el bloqueo de este pasaje a través de la interrupción de la ruta de señalización PI3K/CD38/cADPR reduce los síntomas alérgicos³². Al mismo tiempo, los antígenos pueden abandonar el lumen por una segunda vía de paso transcelular, ruta que protagonizan las células M asociadas a las placas de Peyer⁴¹; el transporte de antígenos alimentarios por parte de las células M es muy efectivo⁴², porque estas células están morfológicamente especializadas para facilitar la endocitosis de los antígenos⁴³. Adicionalmente, las células M expresan en su membrana el MHC de clase II y presentan gránulos ácidos, lo que indica que participan también en la presentación de antígenos³⁹.

Cabe mencionar, que la captura de los antígenos puede producirse también gracias al muestreo del lumen intestinal que realizan los macrófagos CX3CR1⁺. Estos macrófagos emiten prolongaciones de su citoplasma que discurren entre las células epiteliales hasta alcanzar el lumen, y gracias a estas dendritas transepiteliales capturan los antígenos que posteriormente proporcionarán a las células dendríticas⁴⁴.

Otro elemento que forma parte estructural de la barrera epitelial y que tiene un papel inmunorregulador, es la capa de moco que tapiza el epitelio, esta capa tiene la densidad lo suficientemente laxa como para permitir el paso de los nutrientes y lo necesariamente restrictiva como para impedir el acceso a los patógenos⁴⁵, esto

lógicamente puede influir en la capacidad de determinados alérgenos para contactar con las APC. Además de esto, las mucinas que componen el moco, como por ejemplo la glicoproteína MUC2, tienen un efecto inmunorregulador de especial relevancia, esta glicoproteína estimula la producción de mediadores tolerogénicos por parte de las células dendríticas, como la interleuquina 10 (IL-10), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β del inglés *transforming growth factor beta*) o el ácido retinoico⁴⁶.

Finalmente, el último elemento que es necesario mencionar y que forma parte de la barrera mucosa es la población de bacterias comensales residentes en esa región, estas bacterias ejercen un efecto inmunoregulador beneficioso principalmente por dos vías. La primera vía es mediante la estimulación del GALT proporcionando antígenos propios de estas bacterias comensales, este proceso es necesario para el desarrollo y la maduración del GALT⁴⁷⁻⁵⁰. En ratones sin colonizar por bacterias se ha observado tanto una disminución de la población de células T reguladoras y de la secreción de IL-10, como un incremento de la sensibilización a alérgenos^{51,52}. El otro modo en que la microbiota ejerce su influencia inmunorreguladora es mediante la producción de diversos metabolitos, principalmente inosina y ácidos grasos de cadena corta (SCFA del inglés *short chain fatty acids*), que promueven un perfil tolerogénico en el GALT incrementando la producción de IL-10 y favoreciendo la diferenciación de los linfocitos en células T reguladoras⁵³⁻⁵⁵.

Todo lo anterior pone de manifiesto la importancia de la integridad del epitelio intestinal, y es que la presencia de filtraciones o alteraciones en el epitelio es crítica para que se desarrolle la reacción inmune pro Th2 que estimula la producción de IgE específica. Estas filtraciones, o menoscabos, pueden aparecer tras un ataque que puede iniciarse a partir de múltiples fuentes ambientales como patógenos, partículas de polen, actividad proteasa de los propios alérgenos alimentarios o cambios desfavorables en la microbiota (disbiosis)^{56,57}. Por lo tanto, en el inicio de la sensibilización tienden a converger dos fenómenos relacionados con el deterioro de la mucosa, la captación de los

alérgenos por parte de las células presentadoras de antígenos, ya sea por la activación de las rutas de paso transcelulares o la pérdida de integridad en la ruta paracelular, y la producción de mediadores inflamatorios por parte del epitelio que favorecen el sesgo hacia una activación Th2. Tras el menoscabo de la mucosa se liberan sustancias, de origen proteico o no, que presentan patrones moleculares asociadas al daño (DAMPs del inglés *damage-associated molecular patterns*)⁵⁸, estas sustancias son reconocidas por diversas células del sistema inmunitario mediante alguno de los distintos tipos de receptores de reconocimiento de patrones (PRR del inglés *pattern recognition receptor*)⁵⁸ que expresan e inducen su activación. Los DAMPs más asociados a los daños en la mucosa epitelial intestinal son las citoquinas alarminas, como por ejemplo pueden ser la IL-25, TSLP o la IL-33^{58,59}. Estas alarminas inducen las respuestas inmunes de tipo 2 mediante la activación de las células dendríticas residentes en la lámina propia y también la activación de otros linajes como las células linfoides innatas de tipo 2 (ILC2)⁵⁸⁻⁶¹.

3.2 Sensibilización

En la sección que precede a esta, se ha descrito cómo se origina un contexto proinflamatorio que promueve la activación de las células dendríticas y otras células del sistema inmune innato como las células ILC2. A continuación, se van a detallar los procesos celulares que finalizan con la producción de IgE del alérgeno y la consecuente sensibilización.

En primer lugar, se puede considerar que la sensibilización comienza con la activación de las células dendríticas, esta activación es necesaria para estimular la producción de IgE y se caracteriza por la captación, procesamiento y presentación del antígeno en los complejos MHC-II de su membrana⁶². Esto se realiza con una modificación celular paralela hacia un estado de maduración que se define con un incremento de la expresión de las proteínas clúster de diferenciación 80 (CD80) y 86 (CD86), de activación 40 (CD40), de migración CCR7, TIM-4 y OX40L en su membrana⁶³.

Este proceso culmina con la migración dependiente de CCR7 de las células dendríticas a los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM)/GALT, donde se produce la presentación en el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II) de los fragmentos del alérgeno procesado⁶⁴ a los linfocitos T⁶⁵. Simultáneamente, las células ILC2 activadas por las alarminas, especialmente IL-25, secretan interleuquinas como la IL-4, la IL-5, la IL-9 y la IL-13 que sesgan la respuesta de estas células al alérgeno hacia una respuesta proinflamatoria de tipo 2^{60,66-68}, siendo esenciales la IL-4 y la IL-13 para inducir el cambio de isotipo en las células B⁶⁹. Es entonces cuando la reacción de hipersensibilidad se traslada a los nódulos linfáticos mesentéricos que circundan el intestino, aunque también se puede producir en otras regiones del GALT.

Durante la respuesta inmune, los linfocitos inmaduros o vírgenes (Th0) han de recibir tres señales para que se diferencien hacia células T helper 2, efectoras o foliculares. La primera señal es la específica que se origina por la interacción entre el receptor de las células T (TCR del inglés *T cell receptor*) y el antígeno procesado en el entorno del complejo de histocompatibilidad en la membrana de las células dendríticas⁶⁴. La segunda señal la constituyen los coestímulos de CD80(B7.1) y CD86(B7.2) recepcionados por el receptor de las proteínas de la familia B7 presente en la membrana de los linfocitos CD28⁶⁴. Por último, la tercera señal la forman todos los elementos que promueven el fenotipo Th2 en los linfocitos que incluyen liberación de citoquinas y quimioquinas. Para esta diferenciación son clave dos proteínas presentes en las membranas de las células dendríticas activadas, OX40L y TIM-4, que se unen a las proteínas de los linfocitos T OX40 y TIM-1 respectivamente, estas interacciones han demostrado ser críticas para el desarrollo de la respuesta de tipo Th2⁶⁴. Otro elemento esencial para adquirir el fenotipo Th2 son las señalizaciones de las citoquinas IL-2 e IL-4, a través de los factores de transcripción STAT5 y STAT6 respectivamente⁶⁴. Paradójicamente, la IL-4 es probablemente el producto más importante secretado por las células Th2, pero se necesita una fuente alternativa previa de IL-4 que posibilite la

diferenciación de los linfocitos en este fenotipo Th2, como por ejemplo pueden ser los basófilos⁶⁴. Además, la IL-2 aumenta en los linfocitos la expresión del receptor alfa de IL-4 (IL-4 α)^{64,70} y facilita la transcripción de la propia IL-4^{64,70}, alimentando el bucle de retroalimentación positivo pro-fenotipo Th2, la IL-2 en los NLM es producida por los linfocitos T tras las señales 1 y 2 de su activación^{64,70}. Esta señalización por IL-2 es más potente en las zonas fronterizas entre células T y B del nódulo linfático, debido a la menor presencia de células T reguladoras⁶⁴, favoreciendo el estímulo de las células B que se describirá posteriormente. Finalmente, tras producirse todos los eventos que promocionan la adquisición del fenotipo Th2 por parte de las células T se obtienen tres subpoblaciones de células T, Th2 efectoras, Th2 foliculares (Thf2) y en menor medida Th13 foliculares (Thf13) siendo las Th2 las mejores estudiadas⁶⁴. Las células Th2 efectoras se caracterizan por abandonar los nódulos linfáticos para ejercer su función localmente mediante la secreción de grandes cantidades de citoquinas Th2, estas células tienen un rol secundario durante la sensibilización⁷¹. Por otro lado, las células Thf2 y Thf13 son responsables de la activación alérgeno-específica de los linfocitos B que induce el cambio de isotipo de la cadena pesada de las inmunoglobulinas de tipo M/G a tipo E en los centros germinales de los nódulos linfáticos^{71,72}.

A continuación, acontece la inducción del cambio de isotipo y la producción masiva de IgE en los linfocitos B. El proceso de cambio de isotipo a tipo E, que tiende a producirse secuencialmente desde IgM hasta IgE pasando por IgG, se conoce como recombinación de cambio de clase; porque se debe producir un reordenamiento del gen, *IGH* en humanos o *Igh* en ratones, que codifica la cadena pesada de las inmunoglobulinas⁷³. En este gen se puede encontrar una región que contiene en tándem las múltiples versiones de la región C o constante de la cadena pesada, estas regiones C definen el isotipo de la cadena pesada, y son μ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\alpha 1$, $\gamma 2$, $\gamma 4$, ϵ y $\alpha 2$ en humanos y μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2b$, $\gamma 2a$, ϵ y α en ratones; y por lo tanto es esencial la configuración del transcrito que se genera, y finalmente se traduce, para definir el isotipo de la inmunoglobulina⁷³.

Esta recombinación de cambio de clase depende necesariamente de dos eventos: de la promoción de la transcripción del gen que codifica la cadena pesada, y de la actividad de una deaminasa inducida por activación de los linfocitos B (AID del inglés *activation induced deaminase*), que facilita el corte del ADN por la conversión de citoquinas en uracilos⁷³; estos dos eventos se encuentran regulados por la acción de los linfocitos Thf por dos vías diferentes.

La primera ruta es la que induce la transcripción del gen de la cadena pesada, y está compuesta por las vías de señalización de las citoquinas secretadas por las Thf2 y Thf13, principalmente las interleuquinas IL-4 e IL-13. Los linfocitos B presentan dos tipos de receptores para la IL-4, el tipo I que se compone de la cadena IL4-R α y la cadena común γ C, y el tipo II en el que la γ C se sustituye por la cadena IL13-R α ; el receptor de tipo I es exclusivo para la IL-4 mientras que al receptor de tipo II pueden unirse tanto IL-4 como IL-13⁷⁴. La unión de estas interleuquinas a los receptores de tipo I o II, siendo la unión entre la IL-13 y el receptor tipo II la interacción más estable y potente⁷⁴, promueve la transcripción del gen IGH en una cascada de señalización intracelular gobernada por el factor de transcripción STAT6^{74,75}. Además, recientemente, se ha descubierto que la producción de IL-13 por parte de la población Thf13 es vital para producir la IgE específica de alta afinidad que es esencial para la degranulación de los mastocitos⁷⁶.

La segunda vía de señalización es aquella en la que interviene el contacto directo célula-célula entre las células Thf2 y los linfocitos B, y que provoca la activación de la enzima AID. Esta señal es recibida por el linfocito B a través de CD40, situado en su membrana, que se une al clúster de diferenciación 154 (CD154), también conocido como CD40L, y que se expresa en la membrana β de los linfocitos Thf2 tras la interacción específica del complejo formado por el receptor TCR y el complejo de diferenciación 4 (CD4) con el MHC II cargado con el péptido del alérgeno, que se sitúa en la membrana del linfocito B^{73,74}. Esto último, la carga del péptido en el MHC II, es el proceso que

confiere la especificidad a los linfocitos B y a su vez a la IgE. El receptor de células B (BCR del inglés *B Cell Receptor*), que es muy similar a las IgM, se une al antígeno y da comienzo a su internalización y procesamiento que finaliza en la presentación en el MHC II^{74,75}. La señalización de CD40 en los linfocitos B activa una cascada de señalización interna donde intervienen factores de transcripción de la familia NF κ B que incrementan la expresión de la deaminasa AID, promoviendo por lo tanto el proceso de recombinación⁷⁴. Además, la interacción entre la faceta APC de los linfocitos B y las células Thf exagera la producción de las citoquinas Th2 que favorecen el cambio de isotipo, esto se produce por el aumento en la membrana de las células B de las proteínas coestimuladoras de la familia B7, CD80 y CD86, que se unen a CD28 en las células T⁷⁷.

Todos los procesos anteriormente descritos desembocan en la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas que producen grandes cantidades de IgE específica para el alérgeno. No obstante, la sensibilización finaliza con la unión de la IgE a los receptores de alta afinidad de la IgE (Fc ϵ RI) presente de forma constitutiva en la membrana de las células efectoras, basófilos y mastocitos, además de en otros tipos celulares como por ejemplo las células dendríticas. La unión de la IgE al receptor Fc ϵ RI estabiliza el receptor e incrementa su expresión en las membranas de mastocitos y basófilos, aumentando la supervivencia de los mastocitos, pero no de los basófilos^{78,79}. En la figura 4, se resumen gráficamente todos los procesos expuestos hasta ahora en esta sección.

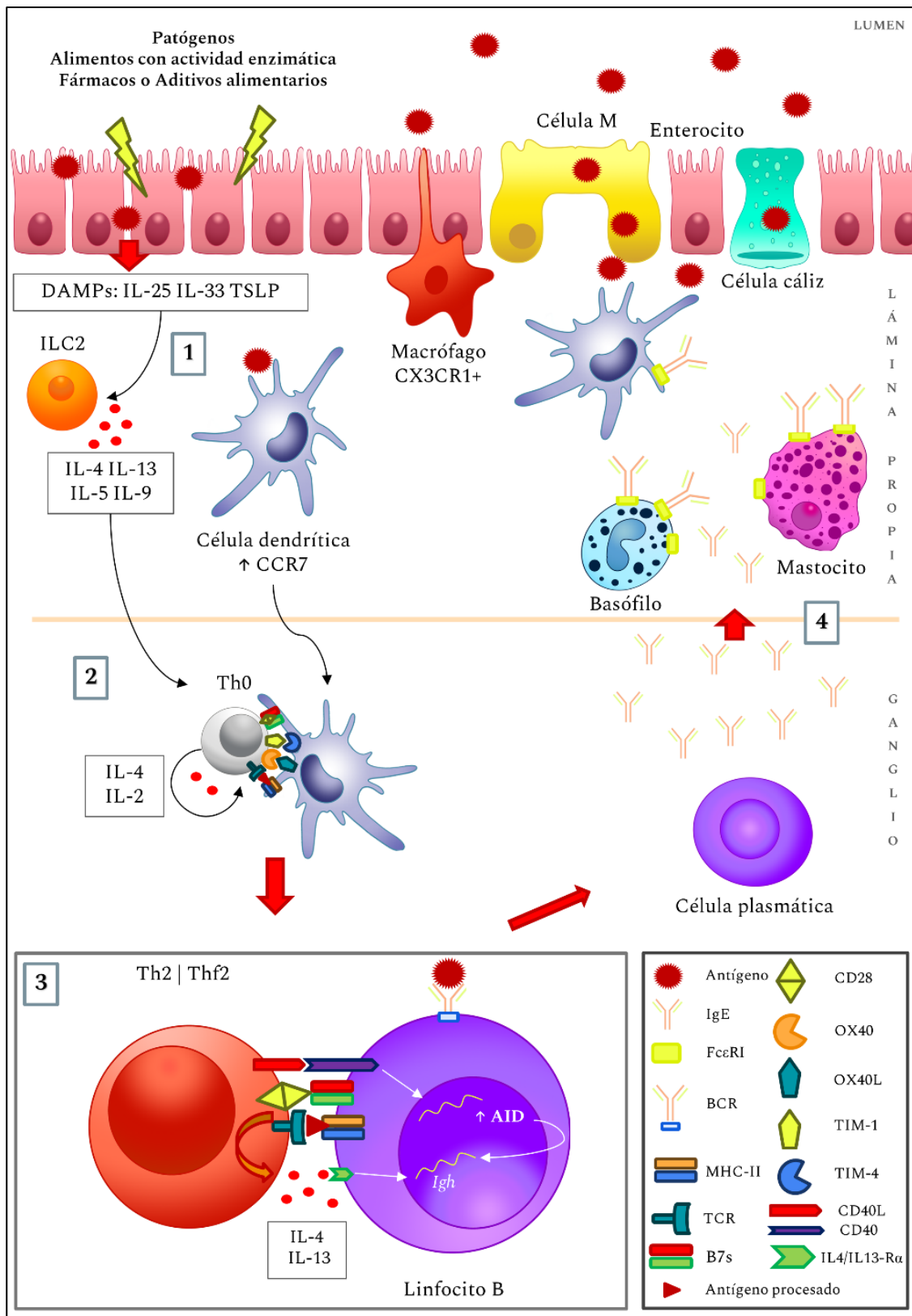


Figura 4. Mecanismos inmunológicos involucrados en la sensibilización a los alérgenos alimentarios: [1] captación de los alérgenos y activación de las AP, [2] diferenciación de los linfocitos Th2, [3] cambio de isotipo y activación de los linfocitos B, [4] producción de la IgEe y sensibilización.

3.3 Fase efectora de la respuesta alérgica

Tras la sensibilización, múltiples células del sistema inmune quedan armadas por la unión de la IgE para el antígeno a los receptores de su membrana, y ante un segundo encuentro con el alérgeno la unión de éste con varias moléculas de IgE desencadenará una respuesta rápida y amplificada. En la Figura 5 se representa gráficamente el proceso que se describe a continuación.

La respuesta efectora se caracteriza primordialmente por la unión del alérgeno de forma entrecruzada o *crosslinking* a más de una IgE anclada a receptores de alta afinidad adyacentes en la membrana de mastocitos y basófilos; este tipo de unión es esencial para que los receptores FcεRI se agreguen en la membrana celular, desatando la cascada de señalización interna que culmina con la activación y secreción de los mediadores inflamatorios⁷⁸⁻⁸¹, este proceso es conocido como degranulación. Recibe este nombre porque mastocitos y basófilos liberan masivamente los gránulos citoplasmáticos preformados en su citoplasma, y que contienen un conjunto heterogéneo de compuestos bioactivos que van a mediar y provocar los síntomas característicos de la alergia a alimentos en este caso mediada por IgE. Entre las sustancias liberadas en la primera oleada secretora destacan la histamina, proteasas como la triptasa o la carbopeptidasa A3, y proteoglicanos como la heparina o el condroitín sulfato⁸¹. Tiene especial importancia la histamina, pues es responsable de los efectos que afectan a los vasos sanguíneos y que en los peores pronósticos conducen hasta la anafilaxia e incluso la muerte^{81,82}. Posteriormente, entorno a los 15 minutos que siguen a la degranulación, mastocitos y basófilos comienzan a producir y a secretar nuevos mediadores proinflamatorios lipídicos como leucotrienos y prostaglandinas (LTB4 o LTC4), que tienen diversos efectos quimiotácticos e inflamatorios, como la inducción de la broncoconstricción^{81,83}. Además de los anteriores, basófilos y mastocitos, secretan diversas citoquinas y quimioquinas, como por ejemplo el TNF-α, que se encuentra entre los gránulos preformados y promueven la captación de otras células inmunes como

neutrófilos o eosinófilos^{81,84}. Otras citoquinas secretadas son: la IL-3 que estimula la proliferación de mastocitos, y la producción de la IL-4, la IL-13, la IL-5 o el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), estos dos últimos junto con la IL-13 estimulan el aumento y activación de los eosinófilos⁸⁵. Esta respuesta, que se prolonga hasta pasadas horas desde la exposición, se la conoce como fase tardía⁸⁶.

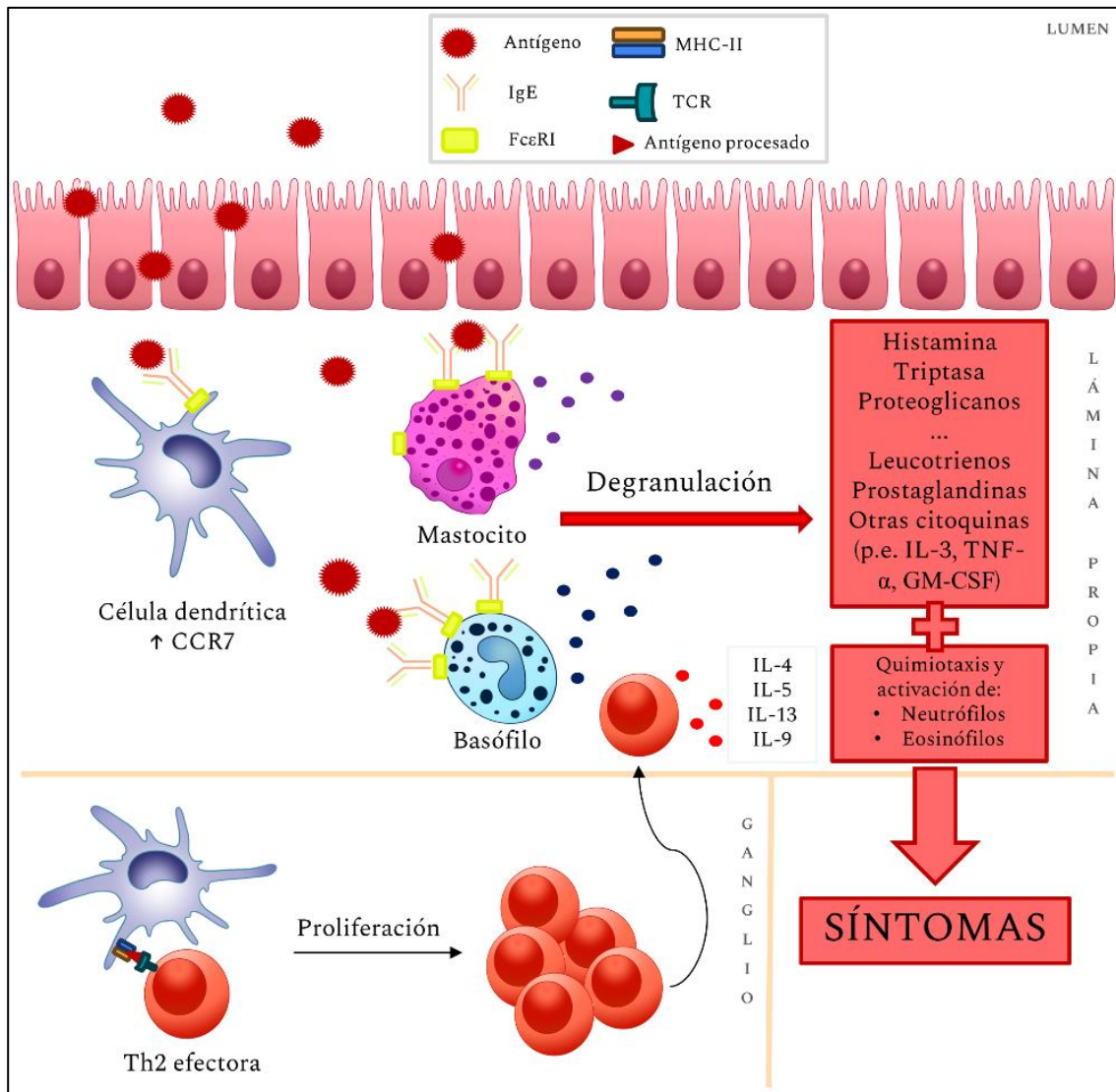


Figura 5. Resumen de los mecanismos inmunológicos involucrados en la fase efectora.

A pesar de que esta fase efectora se caracteriza por la actividad de mastocitos y basófilos, también se produce una amplificación de la respuesta por la señalización de la IgE en otras poblaciones celulares. En las APC, como las células dendríticas, se produce una internalización de los alérgenos unidos dependiente de IgE que es entre 100-1000

más efectiva que la endocitosis o pinocitosis⁷⁸, esto se observa también en el transporte transepitelial de los alérgenos⁷⁸⁻⁸⁰. Por otro lado, la presencia del receptor de baja afinidad de la IgE, conocido como FcεRII o clúster de diferenciación 23 (CD23), en los linfocitos B puede incrementar la respuesta de las células T y por lo tanto la eventual producción de IgE gracias a su actividad como APC^{78,87}, aunque puede tener también un papel inhibitorio dependiendo del contexto molecular de la célula B⁸⁶.

3.4 Manifestaciones clínicas de la alergia a alimentos mediada por IgE

Tras el fracaso de la tolerancia y el desencadenado de la respuesta efectora se manifiestan una serie de signos y síntomas que caracterizan a las reacciones alérgicas a los alimentos mediadas por IgE. A continuación, se exponen las manifestaciones más relevantes que aparecen frecuentemente en esta enfermedad. Es necesario añadir, que diferentes estudios han observado que la frecuencia con la que aparecen diversas de estas manifestaciones está condicionada a la edad de los pacientes. Por ejemplo, en casos de anafilaxis, los bebés presentan habitualmente vómitos y urticaria, los niños preescolares sibilancia y estridor, y desde la adolescencia en adelante es más frecuente encontrar manifestaciones subjetivas como dificultad al respirar o tragar⁸⁸⁻⁹⁰. Las manifestaciones clínicas pueden afectar a prácticamente todas las regiones del organismo, incluyendo el tracto respiratorio, el sistema gastrointestinal o la piel⁸⁸.

En la Figura 6 se esquematiza la distribución por el organismo de los principales síntomas. En el tracto respiratorio podemos localizar los síntomas por la porción de este a la que afectan, de afectación general encontramos la sibilancia, que puede producirse por la inflamación y estrechamiento de cualquier porción del aparato respiratorio. Este síntoma puede presentar distintos grados de gravedad, que van desde la leve sibilancia espiratoria, hasta el asma exacerbado, el cual puede llegar a producirse incluso por la inhalación de los alérgenos alimentarios⁸⁸. De entre las porciones particulares del tracto respiratorio destaca la laringe, que se ve afectada por carraspeos, tos, estrechez o dolor

de garganta; los síntomas más moderados pueden ser la ronquera o la sequedad de garganta, mientras que los más severos serían el estridor y la obstrucción completa, en ese orden^{88,91}. En la porción superior del tracto respiratorio también podemos encontrar síntomas de aparición frecuente, como picor de nariz, rinorrea o congestión nasal. Además, asociados a estos últimos pueden encontrarse síntomas oculares como lagrimeo, enrojecimiento, picor e incluso inflamación periorbital^{88,89,91}.

En el sistema gastrointestinal aparecen diversos síntomas, entre los que tienen un carácter objetivo podemos encontrar los vómitos y la diarrea, y entre los subjetivos el dolor abdominal, la náusea y el picor de boca o garganta. Existen otros síntomas gastrointestinales que pueden aparecer de forma no inmediata y que se asocian con la acción de mecanismos inmunes innatos o adaptativos no mediados por IgE, por ejemplo, estreñimiento o malabsorción prolongada en el tiempo^{5,88}. Dentro de las manifestaciones gastrointestinales se encuentra el síndrome de alergia oral, que también se conoce como síndrome de alergia a alimentos asociado a polen, ya que puede desencadenarse por reactividad cruzada tras la exposición a un antígeno alimentario homólogo a un antígeno polínico⁹², a pesar de que también se manifiesta en pacientes con alergia a LTPs en ausencia de polinosis asociada⁹³. Este síndrome se presenta en más del 50% de los pacientes alérgicos a frutas frescas o vegetales⁹⁴, y se caracteriza por presentar prurito u hormigueo orofaríngeo que puede acompañarse de angioedema labial, urticaria peribucal y otros síntomas cutáneos en la región^{92,95}; también se caracteriza por una resolución espontánea de las manifestaciones un plazo corto de tiempo.

A nivel cardiovascular y neurológico se originan los síntomas más graves, como la pérdida de consciencia, el colapso vascular severo e incluso la muerte; otros síntomas que afectan a estos sistemas son la hipotensión, la taquicardia, mareos, debilidad o cambios en el estado mental^{88,91}. Además, es importante añadir que a estas dos familias de síntomas las suele acompañar la aparición de manifestaciones en otros sistemas.

Por último, es indispensable destacar las manifestaciones cutáneas que aparecen por mediación de la IgE, ya que son las más frecuentes, y principalmente se componen de erupciones eritematosas, prurito, urticaria y/o angioedema. Las manifestaciones cutáneas leves suelen incluir prurito, persistente o no, y con y sin presencia de urticaria. En la urticaria aparecen ronchas, que no son más que edemas circundados por eritema y que suelen producir picor. Esta sintomatología tiene una aparición inmediata tras la ingestión y suele resolverse de forma espontánea con el transcurso de unas horas. Por otro lado, el angioedema afecta a capas más profundas de la piel y suele presentarse de forma característica como una inflamación de párpados, cara o labios. La gravedad de estas reacciones está fuertemente marcada por el porcentaje de piel involucrada^{88,96}.

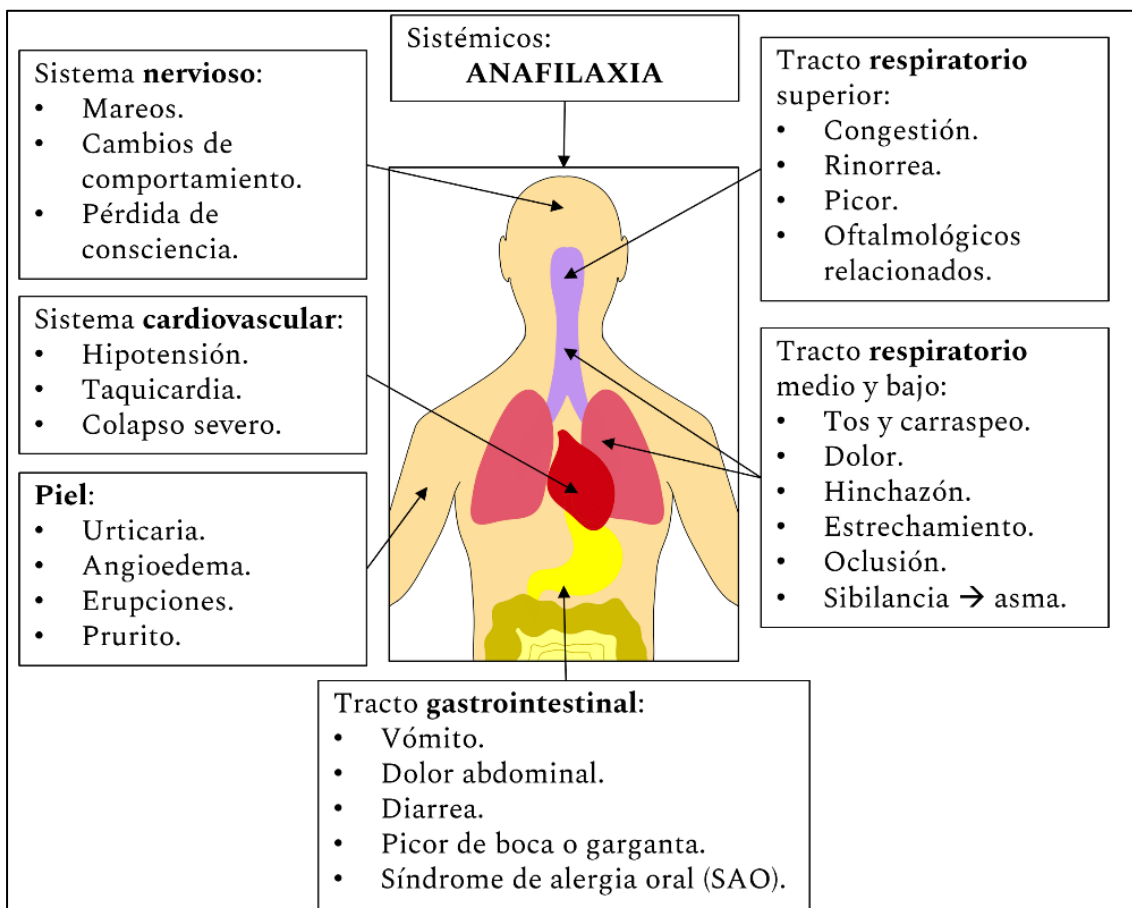


Figura 6. Distribución por el organismo de las manifestaciones clínicas características de las reacciones alérgicas a los alimentos mediadas por IgE.

Por último, existe un tipo de reacción grave en las hipersensibilidades mediadas por IgE, que involucra a múltiples órganos y se denomina anafilaxia. Puede por lo tanto incluir en sus manifestaciones síntomas cutáneos juntamente con manifestaciones respiratorias, gastrointestinales, cardiovasculares y/o neurológicas. Este tipo de reacción se desencadena de forma inmediata y tiene efectos potencialmente fatales, por lo que la Organización Mundial de la Salud clasifica la anafilaxia en 5 grados en función de su gravedad. En la tabla 1 se detallan las características que determinan la severidad de una reacción anafiláctica^{88,89}. Un porcentaje importante de las anafilaxis (20%) pueden desarrollar una reacción bifásica, en la que aparece una reacción tardía que inicia hasta 8 horas después de la exposición⁹⁵.

Tabla 1 – Grados de gravedad de la anafilaxia según la organización mundial de la alergia.

Grado	Definición
I*	Un único sistema involucrado, incluyendo cutáneo, ocular y respiratorio.
II*	Involucra dos de los sistemas anteriores y/o síntomas gastrointestinales,
III	Agravado de los síntomas en el tracto respiratorio inferior, o gastrointestinales, y/o aparición de manifestaciones clínicas uterinas (calambres o sangrado).
IV	Se manifiestan síntomas respiratorios severos.
V	Fallo respiratorio, colapso cardiovascular, pérdida de consciencia.

3.5 Características alergénicas de las proteínas de origen vegetal

Anteriormente, se ha mencionado como los antígenos de origen alimentario pueden tener unas propiedades biológicas o unas características fisicoquímicas que faciliten su entrada en la lámina propia, por ejemplo, determinados alérgenos alimentarios tienen actividad cisteína proteasa, lo cual debilita las uniones estrechas entre las células del epitelio. Asimismo, las proteínas de los alimentos también presentan otras características que le proporcionan alergenicidad.

Con el paso de los años y el estudio pormenorizado de los alérgenos alimentarios en pro de encontrar el origen de la sensibilización, se han encontrado diversas características fisicoquímicas que condicionan el desarrollo de la alergia a los alimentos, siendo las más relevantes: la solubilidad, la estabilidad, el tamaño y la conformación tridimensional de la proteína, y de esta última emergen al menos parcialmente las anteriores⁹⁷⁻¹⁰⁰. En cuanto al tamaño, se considera que no es viable producir una respuesta con tamaño inferior a 4-6 KDa¹⁰⁰, sin embargo, existen los haptenos que son moléculas de pequeño tamaño que en unión covalente con una proteína de mayor tamaño puede desencadenar la respuesta alérgica¹⁰⁰.

Conformacionalmente, la alergenicidad de una proteína puede verse afectada por la estructura secundaria, terciaria e incluso cuaternaria, pues son estas conformaciones las que pueden aproximar regiones no consecutivas de la secuencia de aminoácidos que potencialmente puedan ser reconocidas por los receptores de las células B^{77,101}. Las regiones inmunodominantes, es decir que las regiones que interactúan preferentemente con el sistema inmunitario se conocen como epítomos. Un mismo antígeno alimentario puede presentar diversos epítomos que pueden configurarse en la proteína de dos formas: una lineal en la que toda la información está contenida en la estructura primaria de la proteína y que puede ser reconocida por los receptores de células T, los receptores de células B y las inmunoglobulinas; y una conformacional en la

que es necesaria una determinada estructura tridimensional, y que preferentemente es reconocida por los linfocitos B y otras células presentadoras de antígenos^{77,101}.

Además, al plegamiento de una o varias cadenas de aminoácidos hay que sumar el efecto de las modificaciones postraduccionales, que pueden generar nuevos epítomos y/o proporcionar mayor estabilidad y resistencia a la degradación; resulta sencillo entender la importancia de esta última cualidad, puesto que permite mantener intactos los epítomos y sus otras cualidades alergénicas⁹⁷. De entre todas las modificaciones postraduccionales, o co-traduccionales, destaca la glicosilación. La glicosilación de las proteínas consiste en la adición de uno o varios glúcidos a las cadenas laterales de sus aminoácidos, principalmente a grupos aminos (N-glicosilación) o grupos hidroxilo (O-glicosilación), y biológicamente tiene un papel activo en procesos celulares como la adhesión o la comunicación intercelular. La glicosilación en sí misma, o por los distintos patrones de distribución o de ramificación que puede adoptar, confiere a las proteínas mayor resistencia a la degradación, mayor polaridad, que a su vez puede aumentar la solubilidad y la capacidad de unir cationes de calcio, y también favorece conformaciones estructurales que permiten exponer al sistema inmunitario los epítomos de los que forman parte^{98,102}. Las proteínas glicosiladas interaccionan con receptores específicos como el receptor DC-SIGN (del inglés *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*). Este receptor de tipo lectina está presente en las células presentadoras de antígenos y participa en la actividad proinflamatoria de estas células¹⁰³.

Por último, algunos motivos proteicos que incrementan la capacidad alergénica, y por tanto también los epítomos asociados, pueden encontrarse ubicuamente en la naturaleza, porque tienen una funcionalidad igualmente extendida. Estas familias de proteínas emparentadas por su alergenicidad se conocen como panalérgenos¹⁰⁴, por lo tanto, estos grupos de proteínas presentan regiones en su secuencia primaria que guardan una fuerte homología, a pesar de no tener una relación taxonómica estrecha¹⁰⁴.

En la actualidad se conocen unas pocas familias de panalérgenos, incluyendo las tropomiosinas, profilinas, polcalcinas y LTPs. Las LTPs son responsables de las reacciones cruzadas mediadas por IgE entre distintos alérgenos alimentarios de origen vegetal y el polen de otras especies vegetales^{104,105}. Este fenómeno tiene especial importancia porque puede desarrollarse una sensibilización múltiple que dificulte la evitación de los alérgenos, especialmente en determinadas regiones geográficas¹⁰⁶.

3.5.1. Alérgenos de origen vegetal

Se han identificado alérgenos de más de 80 especies vegetales diferentes, una cantidad insignificante si se tiene en cuenta el número total de especies vegetales existentes¹⁰⁴. Y solo una porción de éstas producen alergias de tipo alimentario, y son principalmente, legumbres como la soja o el cacahuete, frutas, frutos secos o el trigo^{98,104}. Además, más del 60% de los antígenos alimentarios pueden agruparse en cuatro familias/superfamilias de proteínas: prolaminas, cupinas, Bet v 1/PR-10s y profilinas^{98,104}. A su vez, estas familias pueden clasificarse en tres grandes grupos funcionales: proteínas de defensa y reguladoras, proteínas estructurales y catalíticas, y proteínas de reserva⁹⁸. En la Tabla 2 se clasifican, en superfamilias y grupos funcionales, las familias de alérgenos vegetales más importantes.

El conjunto de las proteínas estructurales se ve representado principalmente por las profilinas, estas proteínas que pueden encontrarse en más de 50 plantas como el apio, el pimiento, la zanahoria, la manzana o la cereza; las profilinas son especialmente abundantes en el polen de estas plantas, y constituyen la segunda superfamilia en número de proteínas alérgicas descritas⁹⁸. El grupo de las proteínas de defensa y regulación forman proteínas que participan en las respuestas a estrés biótico y abiótico en las plantas, estas proteínas se caracterizan por contener múltiples puentes disulfuro que estabilizan su estructura y les confiere resistencia ante ataques térmicos, enzimáticos y químicos⁹⁷. Miembros importantes son las proteínas de la familia de homólogos de PR-

10, siendo Bet v 1 el miembro más destacado, que pueden encontrarse en frutos como el melocotón, el kiwi, la manzana o la avellana⁹⁸.

Tabla 2 – Clasificación de los alérgenos vegetales más importantes

Función	Superfamilia	Familia	Ejemplos
Estructurales	Profilinas		Bet v 2, Cuc m 2, Cor a 2, Ara h 5
		Vicilinas	Ana o 1, Ara h 1, Jug r 2, Cor a 11
	Cupinas	Leguminas	Gly m 6, Ara h 3, Ber e 2, Fag e 1
		Reservas	Albuminas 2S
Reservas	Prolaminas	Cereales	Gliadina, Glutenina
		LTPs	Pru p 3, Jug r 3, Api g 2, Mal d 3
	Reguladoras	PR-10	

Las proteínas de reserva se encuentran en frutos maduros y son la principal fuente de carbono y nitrógeno en las primeras etapas del desarrollo de las plantas. Siendo sus principales representantes las superfamilias de las prolaminas y de las cupinas. Las cupinas son una superfamilia diversa de proteínas, que se caracterizan por contener en su estructura un dominio compuesto por un barril beta, sus miembros más importantes son las globulinas que a su vez se clasifican en vicilinas y leguminas⁹⁸. Las cupinas se pueden encontrar especialmente en legumbres como la soja, el cacahuete o el guisante,

pero también podemos encontrarlas en otras plantas y frutas como la mandarina. Las prolaminas son la familia de alérgenos vegetales más importante en cuanto número y se forma de diversas familias como las albuminas 2S, las prolaminas de cereales, o las LTP. Se caracterizan por contener un gran número de residuos de prolamina y glutamina y por conservar un motivo de 8 cisteínas que estabilizan su estructura 3D de superhélice; además, se encuentran en multitud de plantas, concretamente en las semillas, como: kiwi, cacahuete, melocotón, trigo, cebada, etc⁹⁸.

Las LTP son prolaminas ya que tienen como función el transporte de lípidos, aunque también se podrían clasificar dentro del grupo funcional de defensa y regulación como la familia PR-14, ya que tienen un papel importante en el tráfico vesicular y la transducción de señales⁹⁸. Las LTP relacionadas con la alergia a alimentos tienen un tamaño de unos 9 KDa y se componen de diversas hélices alfa unidas por bucles cortos que se estabilizan por 4 puentes disulfuro, que estabilizan la estructura glomerular que contiene los bolsillos hidrofóbicos donde se unen los lípidos^{97,107}. Esta estructura también le confiere una alta resistencia a la degradación térmica y enzimática¹⁰⁷, lo que habilita a esta familia de proteínas a sensibilizar por vía gastrointestinal, inhalatoria y cutánea¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Esta familia de alérgenos está presente en muchos alimentos, como en los miembros de la familia *Rosaceae*, que son por ejemplo el melocotón, la cereza, la ciruela, el albaricoque y la manzana. Las reacciones alérgicas a LTP generan principalmente dos cuadros clínicos: uno sistémico, que bien puede ser urticaria y anafilaxia, y otro más localizado que es el síndrome alérgico oral. Y como ya se apuntó en la sección dedicada a la epidemiología en la alergia a alimentos, las causadas por estas proteínas tienen especial relevancia debido a un aumento de la prevalencia y gravedad de las reacciones, fundamentalmente en el sur de Europa^{107,111}; aunque también se viene observando un crecimiento en otras áreas geográficas de Europa, Asia y América¹⁰⁷.

Desde la perspectiva clínica también es necesario mencionar el síndrome LTP, en el que los pacientes sensibilizados a LTP presentan reactividad a múltiples fuentes,

tanto frutas como pólenes no necesariamente relacionados taxonómicamente¹¹¹. Teniendo presente la presencia ubicua de estos panalérgenos, este síndrome incrementa el riesgo de desencadenar una reacción fatal en los pacientes graves. Además, aun en el caso de pacientes con síntomas más leves, el elevado número de alimentos implicados que sería necesario evitar empeora significativamente de la calidad de vida de los pacientes^{112,113}.

4. Tolerancia a los alimentos

En las secciones inmediatamente anteriores se han descrito los mecanismos celulares y humorales que inducen, y suceden, a una pérdida de la tolerancia a los alimentos, lo que implica la existencia de otros procesos inmunitarios que gobiernan las interacciones inocuas e incluso beneficiosas entre los antígenos alimentarios y el sistema inmunitario del huésped. La mayoría de la población desarrolla una respuesta inmune de tolerancia natural mediante diversas estrategias que controlan y anulan las respuestas alérgicas a los antígenos alimentarios. Sin embargo, ocasionalmente esta tolerancia natural se interrumpe y se desarrolla una respuesta alérgica, es entonces cuando se necesita la aplicación de alternativas terapéuticas que generen una respuesta de tolerancia inducida.

4.1 Tolerancia natural

Este procedimiento fisiológico requiere la participación del sistema inmunológico, y al igual que la respuesta alérgica, se inicia tras la captación del antígeno por parte de las células presentadoras de antígenos y su procesamiento y presentación a los linfocitos, principalmente por las células dendríticas residentes en la lámina propia. Sin embargo, el contexto celular y molecular en el que se desarrolla esta respuesta es opuesto al descrito en la fase de sensibilización.

4.1.1 Contexto inmunológico de la tolerancia natural

En condiciones favorables la barrera mucosa epitelial promueve la tolerancia, la mucina MUC2 provee de señales a las células dendríticas para que induzcan el fenotipo T regulador en los linfocitos¹¹⁴, del mismo modo las células epiteliales también favorecen la generación de células T reguladoras (Treg) mediante la activación tolerogénica de las células dendríticas¹¹⁵. Además, las bacterias comensales residentes en la barrera mucosa intestinal proporcionan distintas señales que permiten generar un ambiente tolerogénico. Una de esas señales la componen los antígenos propios de estas bacterias

que son tolerados e inducen una activación esencial para el mantenimiento, desarrollo y maduración del sistema inmunitario¹¹⁶⁻¹¹⁸. La importancia de este proceso se pone de manifiesto en los modelos animales libres de gérmenes, donde se observa una reducción de la presencia de células Treg y de la producción de IL-10¹¹⁸⁻¹²⁰. En este mismo sentido, las interacciones entre la microbiota y el huésped deben fomentar las respuestas adecuadas de tipo T helper 1 que permitan mantener un adecuado equilibrio Th1/Th2^{121,122}. El segundo tipo de señal tolerogénica emitida por la microbiota son los metabolitos como los SFCAs o la inosina, que promueven la diferenciación hacia un fenotipo Treg y la secreción de citoquinas inmunomoduladoras como IL-10^{118,123,124}. Los SFCAs, como el butirato o el acetato favorecen, la tolerancia oral a los alimentos estimulando la actividad de la enzima retinaldehído deshidrogenasa-2 (RALDH2)^{118,124,125}.

Otro agente clave en la adquisición de la tolerancia, que se asocia íntimamente a la barrera mucosa, son las células linfoides innatas de tipo 3 (ILC3 del *inglés innate lymphoid cells type 3*), este linaje linfoide se caracteriza por la expresión del factor de transcripción ROR γ t y pueden tener un rol proinflamatorio o inmunosupresor. Estas ILC3, pueden detectar metabolitos derivados del triptófano producidos por bacterias beneficiosas del género *Lactobacillus* con el receptor de hidrocarburos arílicos, lo que las induce a producir IL-22. A su vez, la IL-22 promueve el mantenimiento de la integridad de la barrera mucosa^{121,126}. Además, las células ILC3 pueden activarse por la recepción de la IL-1 β producida por los macrófagos, los macrófagos detectan los antígenos microbianos y secretan esta interleuquina, la activación de las ILC3 por la IL-1 β induce la producción de GM-CSF por estas células. Y el GM-CSF estimula la producción de IL-10 y ácido retinoico por parte de las células dendríticas y macrófagos^{121,127}. Se ha observado también que en respuesta a la IL-1 β , estas células ILC3 producen IL-2, la cual apoya la respuesta Treg^{128,129}.

4.1.2 Diferenciación de las células Treg periféricas

En este contexto, las células dendríticas adquieren un fenotipo tolerogénico y fomentan la diferenciación y activación de las células Treg. Esto se produce por mecanismos análogos a los descritos durante la sensibilización, donde se produce la presentación del antígeno a los linfocitos en los ganglios linfáticos; pero las células dendríticas tolerogénicas inducen el fenotipo regulatorio con la señalización del ácido retinoico, del TGF- β , y con la metabolización del triptófano por la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO)¹³⁰. El ácido retinoico se produce a partir de la vitamina A por la actividad de la enzima RALDH2 en células dendríticas, y también en macrófagos, y el ácido retinoico se une al receptor nuclear de ácido retinoico (RAR del inglés *retinoic acid receptor*) y al receptor de retinoides X (RXR del inglés *retinoid X receptor*) para promover la expresión de FoxP3^{130,131}. Además, se ha observado que las deficiencias de vitamina A en la dieta se asocian a una disminución de las poblaciones de células T reguladoras FoxP3⁺ y LAP⁺ en el intestino^{130,132}. El TGF- β también induce la expresión de FoxP3, aunque precisa de una inhibición del receptor de la IL-6, entre otros, para que amplifique su señal^{130,133}. Concretamente, la actividad de IDO reduce las concentraciones de triptófano y genera derivados inmunomoduladores de este, lo cual promueve de nuevo las células T reguladoras FoxP3⁺^{130,134}. La expresión de FoxP3 es esencial para la función inmunorreguladora de las células Treg, ya que las células donde se expresa también se observa la expresión del receptor co-inhibidor antígeno 4 de los linfocitos citotóxicos (CTLA4 del inglés *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), del co-estimulador inducible de células T (ICOS) o las citoquinas antiinflamatorias IL-10, TGF- β o IL-35^{130,135}.

En la diferenciación y activación de estas células T reguladoras periféricas también intervienen señales de contacto célula-célula entre las APC y los linfocitos. Esta señalización puede dividirse en distintos ejes DC-Treg, por un lado, está el eje PD-L1/PD-1, donde el ligando de muerte programada 1 (PD-L1 del inglés *programmed death ligand 1*) compete con CD28 por la unión a la proteína co-estimuladora CD80; y su

señalización tras el contacto con PD-1 (del inglés *programmed death 1*) recluta a distintas fosfatasa de esfingosina inhibidoras, que reducen la señalización del receptor de células T^{130,136}. El otro eje DC-Treg es el que componen las proteínas CD80-CD86 y CTLA-4. Este último es también conocido como clúster de diferenciación 152 (CD152) y su contribución al desarrollo de las células T reguladoras es la competición con CD28 por la unión de las proteínas coestimuladoras CD80 y CD86, pero también disminuye la señalización del TCR y la producción de IL-2, dificultando por lo tanto la diferenciación proinflamatoria de linfocitos T CD4⁺ y CD8^{+130,137}. Y el último eje DC-Treg es el que forman ICOS-L/ICOS, esta interacción es posible una vez los linfocitos T se activan y aunque tiene un carácter ambivalente es importante para el desarrollo de los linfocitos T reguladores en la periferia¹³⁰.

A todo lo anterior, hay que añadir otro elemento que resulta crítico en la diferenciación y activación de las células Treg periféricas (pTreg), y que paradójicamente es ejercido por otras células Treg. Esto ha podido observarse en diversos experimentos, de modo que la inhibición dirigida de la actividad T reguladora disminuye la generación de nuevas células Treg^{130,138}, y por el contrario la presencia de células Treg FoxP3⁺ puede modular el fenotipo de células T efectoras hacia uno regulador^{130,139}, este último fenómeno se denomina tolerancia contagiosa. Ésta presenta una adaptación muy ventajosa para los individuos, el contacto temprano con los antígenos derivados de los alimentos induce la generación de una población células Treg periféricas que van a residir en la lámina propia^{130,140} y que crecerá progresivamente a la vez que se van introduciendo en la dieta nuevos alimentos^{130,140}, y estas pTreg a su vez van a promover la tolerancia a nuevos antígenos alimentarios, lo que genera un bucle tolerogénico retroalimentado. Este proceso se resume en la Figura 7.

Con todo lo anterior, puede vislumbrarse como en un ambiente homeostático se induce la diferenciación de las células pTreg. A continuación, se van a exponer los mecanismos que ejercen este conjunto diverso de células para inducir la tolerancia a los

alimentos y suprimir la respuesta alérgica que pueda iniciarse en un momento dado. Para ello se sirven de una batería de citoquinas inhibitoras y de proteínas de membrana que atenúan o anulan las señales inflamatorias¹³⁰.

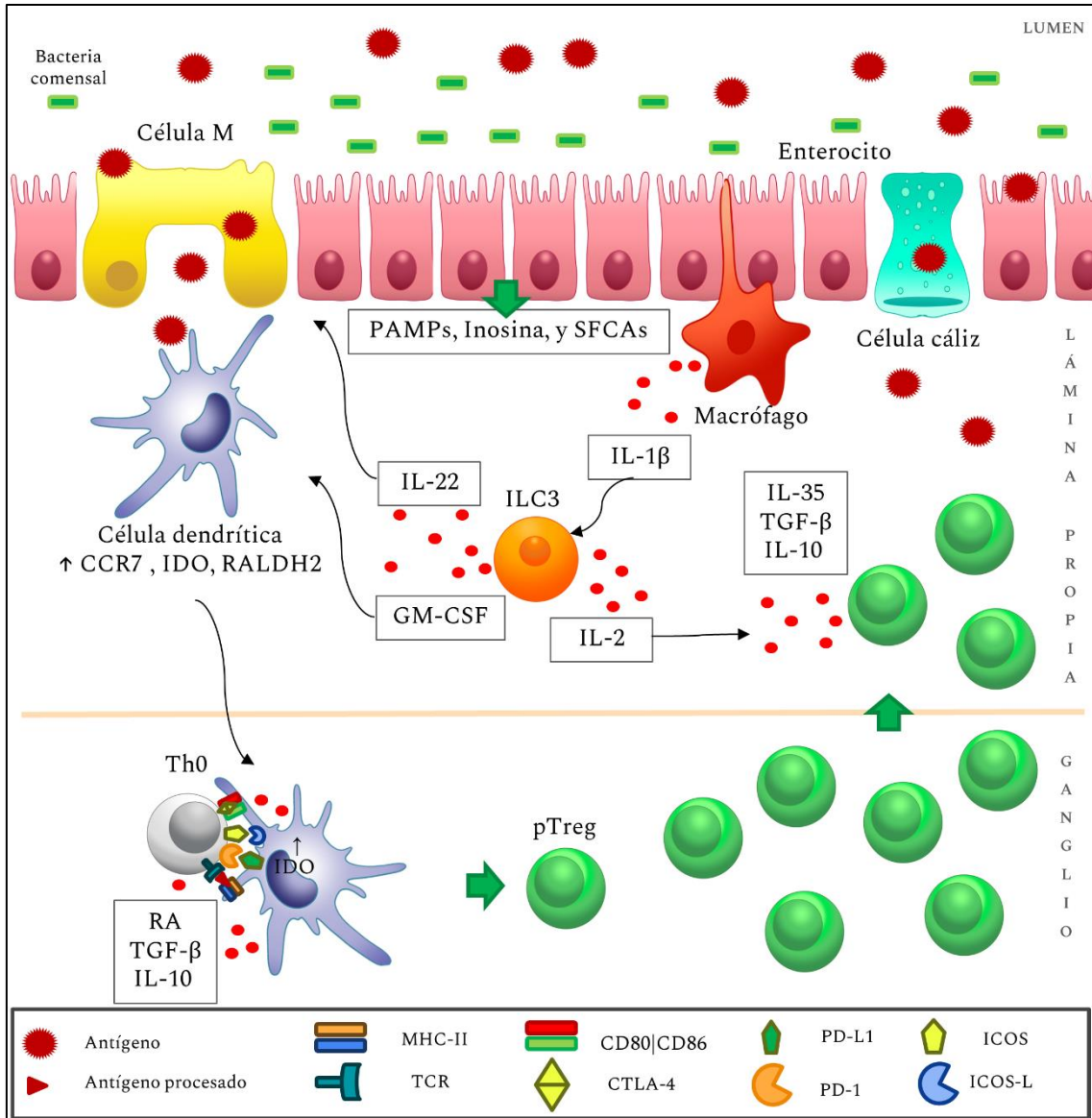


Figura 7. Esquema del establecimiento de la tolerancia a un alérgeno alimentario en el intestino delgado.

4.1.3 Mecanismos efectores de las células Treg en la respuesta de tolerancia a los alimentos

Las citoquinas inhibitoras más importantes producidas por las células Treg son la IL-10, la IL-35 y el TGF- β . La IL-10 es probablemente la interleuquina inhibitora de la respuesta inmune más estudiada, y suprime las respuestas T efectoras sobre todo actuando sobre las APC, en las que reduce la secreción de citoquinas inflamatorias y la presentación de antígenos en el complejo de histocompatibilidad¹⁴¹; tras la unión de la IL-10 en el receptor de la IL-10 (IL-10R) se dispara una cascada interna de tirosín y JAK quinasas que activa principalmente a STAT3. Esta ruta de señalización promueve la expresión de proteínas supresoras como SOCS3, un miembro de la familia de proteínas supresoras de la señalización de citoquinas (SOCS del inglés *suppressor of cytokine signaling*), que van a limitar la respuesta de las APC inhibiendo internamente otras vías de señalización disparadas por otras interleuquinas¹⁴². Defectos en el IL-10R se asocian con un incremento de la inflamación en la lámina propia^{130,143} y un empeoramiento del pronóstico de patologías como la colitis mediada por células T de fenotipo T helper 17^{130,144}. No obstante, la IL-10 producida por las Treg también actúa directamente en las células Th2, inhibiendo la producción de sus citoquinas características IL-4 e IL-13¹⁴⁵⁻¹⁴⁷; sobre los mastocitos, induciendo la apoptosis y reduciendo la producción de citoquinas en la resolución de la respuesta de tipo 2¹⁴⁸. Y también actúa inhibiendo las ILC2, a través de ICOSL^{145,149}, entre otras células.

Al igual que la IL-10, el TGF- β actúa sobre múltiples células del sistema inmunitario mediante los receptores del TGF- β 1 y 2, los cuales dimerizan y se fosforilan para, a su vez, fosforilar a la proteína SMAD2 que forma entonces un complejo con SMAD3 y SMAD4, este complejo finalmente actúa como factor de transcripción antiinflamatorio^{150,151}. Concretamente, el TGF- β es una de las citoquinas más importantes en la inducción de la diferenciación de diversos tipos de células T reguladoras, por lo que buena parte de su efecto inmunomodulador se concentra en este

fenómeno^{130,152}. La última citoquina inhibidora mayor producida por las células T reguladoras es la IL-35, esta citoquina secretada por las Treg FoxP3⁺ suprime las respuestas T efectoras¹⁵³, produce agotamiento de las células T mediante la inducción de PD-1, TIM3 y LAG3¹⁵⁴. También, se ha observado que esta citoquina puede actuar anclada a vesículas que son secretadas por las células Treg, lo cual proporciona un segundo mecanismo de expansión o de contagio de la respuesta tolerante, ya que parte de esta IL-35 unida a vesículas que contienen el clúster de diferenciación 81 (CD81), se transfiere a las membranas de otras células, pudiendo amplificar la señal de IL-35 unirse a los receptores IL-35R de células vecinas y produciendo finalmente los efectos de agotamiento y supresión¹⁵⁴. Este mecanismo de comunicación mediante vesículas CD81⁺ entre las Tregs y otras células T también se ha observado que puede suprimir la respuesta inmune transportando otras sustancias como microARNs supresores^{154,155} o las ectoenzimas CD39/CD73^{154,156}.

Otro mecanismo importante para la tolerancia es la producción de inmunoglobulinas de tipo G4, esto se logra tras un cambio de isotipo que puede suceder desde IgE y por lo tanto puede reducir la producción de IgE. Este mecanismo está controlado por la IL-10, se ha observado que la IL-10 incrementa hasta veinte veces la producción de IgG4 en cultivos de células B¹⁵⁷, y además el bloqueo de la señalización de la IL-10 disminuye la influencia de las células T reguladoras en la promoción del isotipo G4¹⁵⁸. El efecto más relevante observado es la inhibición de la degranulación de mastocitos y basófilos, mediante la competición contra la IgE unida a los receptores de alta afinidad de estas células, ya que la IgG4 tiene mayor afinidad por el alérgeno¹⁵⁹.

4.1.4 Subpoblaciones de células Treg en la respuesta tolerante

Lógicamente, la diversidad de mecanismos efectores de la regulación y/o supresión conlleva aparejada la presencia de múltiples subpoblaciones de células T reguladoras, que pueden definirse por su funcionalidad, su localización y temporalidad.

En primer lugar, tenemos las células Treg naturales, estas células tienen su origen en el timo y su cometido es suprimir las células T autorreactivas mediante interacciones célula-célula, fenotípicamente se caracterizan clásicamente por la presencia constante del CD25 en su membrana, una proteína también conocida como cadena alfa del receptor de la IL-2 (IL-2R)¹⁶⁰⁻¹⁶². Y sin embargo, cada vez es más evidente que las Tregs naturales están gobernadas y se caracterizan por la expresión de un factor de transcripción de la familia *forkhead*, la proteína FOXP3. Este factor de transcripción regula la expresión de multitud de genes implicados en la función efectora de esta célula, como puede ser la IL-10, además de genes dedicados a la proliferación, crecimiento y supervivencia de este tipo celular, lo que lo convierte en un agente esencial para la función inductora de la tolerancia de las células Treg¹⁶⁰⁻¹⁶². Por lo tanto, tenemos una población de células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ que se encargan de suprimir las células T autorreactivas que escapan del timo, garantizando la tolerancia en la periferia¹⁶⁰⁻¹⁶².

En segundo lugar, cabe hablar de las Tregs que se originan en la periferia y se conocen como células Tregs adaptativas, inducidas o periféricas. Son células CD4⁺ (Th0) que también tienen su origen en el timo pero que desarrollan sus características reguladoras o supresoras en los tejidos periféricos, por lo que regulan la respuesta a antígenos extraños y son las responsables de la tolerancia a los alimentos, que es el caso que nos ocupa en las reacciones alérgicas a alimentos^{130,160}. Las células Treg inducidas se pueden clasificar en función a su fenotipo, y por lo tanto por su mecanismo supresor; un elemento clave que las diferencia es la presencia de FoxP3, sin embargo, las células FoxP3⁻ pueden presentar expresión temporal de FoxP3 durante su activación¹³⁰ y a su vez

las células FoxP3⁺ pueden cesar su expresión y perder su función¹³⁰, evidenciando la plasticidad de las células T. Un primer tipo de célula Treg adaptativa son las células T colaboradoras o helper 3 (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻), que secretan TGF-β^{130,160}. Un segundo tipo serían las células Treg Tr1 (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻), que se caracterizan a su vez por la producción de IL-10^{130,160}. Por último, tendríamos las células iTreg o pTreg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺)^{130,160}, estas células constituyen entre 5-10% de las células T CD4⁺ en los tejidos periféricos tanto en ratones como en humanos^{130,163}, incrementándose hasta un 20-30% en la lámina propia del intestino^{130,164}; su ausencia en los nódulos linfáticos mesentéricos resulta en una pérdida de la tolerancia oral^{130,165}.

En la Figura 8 se esquematizan las subpoblaciones de células Treg, y las moléculas efectoras con sus respectivas células diana, involucradas en la respuesta de tolerancia periférica. Tanto en el establecimiento de la tolerancia como en su mantenimiento, colaboran con las células Treg otro número importante de células inmunitarias que presentan un fenotipo regulador, a continuación, se destacan dos de ellas por su relevancia y frecuencia. Existe un conjunto de células B con características inmunosupresoras que contribuyen a la tolerancia en el intestino, por lo que se denominan células B reguladoras (Breg) o células B10, haciendo alusión a la secreción de IL-10¹³⁰. Se ha observado que las células Breg promueven el cambio de isotipo a IgG4¹⁶⁶, y la expansión y activación de las células T reguladoras FoxP3⁺ via IL-10¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Otra población celular de interés con las ILC3, de las que anteriormente hemos descrito su influencia en la tolerancia, ya que su ablación reduce de forma significativa la población de células T reguladoras¹²⁸, poniendo de manifiesto la importancia que tiene la comunicación entre el sistema inmune innato y el adaptativo.

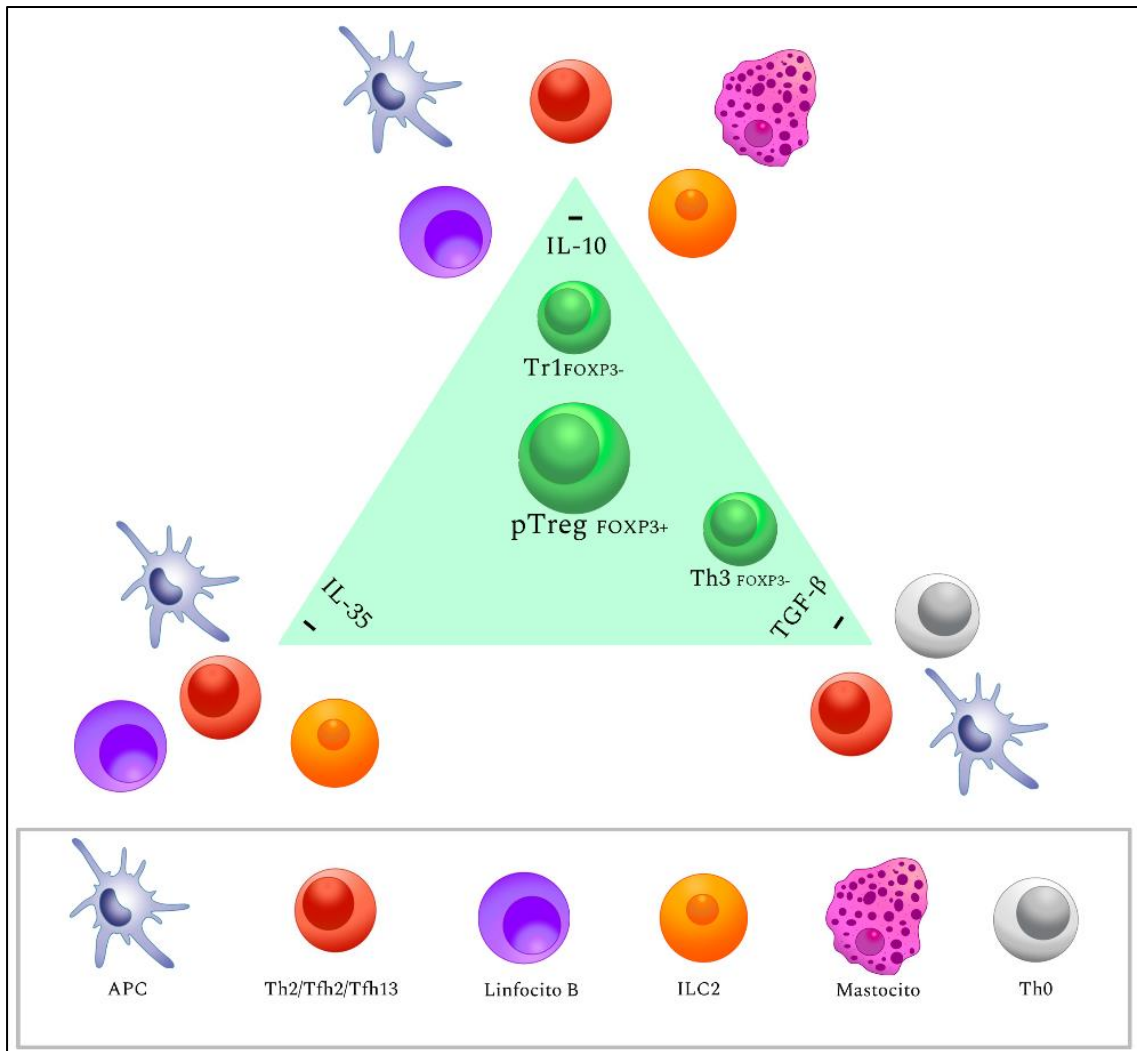


Figura 8. Esquema de los mecanismos efectores y las subpoblaciones de Tregs encargadas de mantener la tolerancia periférica.

En esta sección se han expuesto los principios que rigen la tolerancia natural a los antígenos alimentarios, sin embargo, existen multitud de particularidades, vacíos e interrogantes tanto en los agentes como en los mecanismos involucrados, y en la temporalidad en los que actúan estos.

4.2 Tolerancia inducida

Tradicionalmente, el manejo terapéutico de la alergia a alimentos se ha reducido a la evitación estricta de los alimentos que pudieran ser fuente de alérgenos previamente diagnosticados. Recayendo todo el esfuerzo en la educación y formación de los pacientes, lo que es especialmente sensible en las alergias infantiles, y en la facilitación de los tratamientos farmacológicos de emergencia^{170,171} que puedan remediar una potencial ingestión accidental, que puede llegar a tener consecuencias fatales si no se trata adecuadamente¹⁷².

En la actualidad, el foco terapéutico está desplazándose paulatinamente hacia la prevención de la alergia a alimentos mediante la adquisición de tolerancia natural en las primeras etapas de la infancia. Se ha observado en estudios preliminares que la introducción temprana, tan pronto como a los 3 meses de vida, de alimentos potencialmente alergénicos como el cacahuete, la leche de vaca o el huevo, reduce la prevalencia de la alergia a alimentos^{171,173-176}. Sin embargo, este abordaje de la cuestión no ofrece una solución para aquellos pacientes donde ya se ha manifestado la alergia a alimentos, para esta población se trabaja en diferentes líneas de investigación y desarrollo que tratan de mejorar la calidad de vida de los pacientes, bien por el diagnóstico anticipado y preciso o por inducción de la tolerancia a partir de dicho diagnóstico. El diagnóstico anticipado consiste en el testeo sistemático del alérgeno responsable de la reacción, así como de los co-alérgenos¹⁷⁷, combinando las pruebas diagnósticas habituales (pruebas cutáneas o de detección de IgE específica) con la historia clínica. La inclusión de la historia clínica, o de provocaciones orales, es esencial para discernir las sensibilizaciones con verdadera relevancia clínica¹⁷⁸.

En relación con los tratamientos inmunomoduladores, éstos pueden dividirse en dos tipos, los que actúan en el sistema inmunológico de manera inespecífica y los que son específicos del alérgeno. Los tratamientos no específicos se caracterizan por inhibir

o suprimir alguna vía de señalización proinflamatoria, por lo que habitualmente forman parte de otros tratamientos inmunomoduladores a modo de salvaguarda de la homeostasis inmunitaria, algunos ejemplos son los anticuerpos monoclonales Dupilumab, Omalizumab y el Etokimab. Dupilumab es un anticuerpo monoclonal de IgG4 contra la cadena alfa del receptor de la IL-4, se ha observado su eficacia en un caso clínico donde se confirmó la desensibilización a dos alimentos distintos¹⁷⁹. Etokimab, es un anticuerpo monoclonal de IgG1 diseñado para suprimir los efectos de la IL-33, actualmente está en proceso de validar sus efectos desensibilizadores y/o protectores en un ensayo clínico de alergia a cacahuete (NCT02920021)¹⁸⁰. Por último, Omalizumab, un anticuerpo IgG1 anti-IgE monoclonal humanizado que se estudiado extensamente como tratamiento en las alergias mediadas por IgE¹⁸¹⁻¹⁸³, produce una disminución de la actividad de los basófilos, pero sin promocionar el fenotipo Treg¹⁸⁴. Adicionalmente, se puede ejercer un efecto inmunomodulador inespecífico mediante la promoción de una microbiota con características antiinflamatorias, la cual se puede lograr mediante el tratamiento con probióticos, prebióticos y simbióticos, o mediante el trasplante de microbiota fecal. Diversos estudios clínicos han probado que la administración de probióticos de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* logra inducir tolerancia en pacientes alérgicos a la leche de vaca¹⁸⁵. Además, también se ha estudiado su efecto protector y/o adyuvante en combinación con diversas terapias inmunomoduladoras específicas, como la caseína o la inmunoterapia oral a cacahuete^{184,186}.

4.2.1 Inmunoterapia específica de alérgeno en alergia a alimentos vegetales

Los resultados más prometedores en cuanto a la restauración de la tolerancia se han alcanzado mediante tratamientos inmunomoduladores específicos del alérgeno (AIT del inglés *allergen-specific immunotherapy*). A continuación, van a describirse distintas modalidades de este tratamiento y las innovaciones que buscan optimizar sus resultados.

Primero, la forma más primitiva de esta modalidad de inmunoterapia es aquella basada en la aplicación de extractos alérgicos, este tipo de tratamiento expone a los pacientes a cantidades controladas de alérgeno para inducir de forma segura diversos mecanismos de promoción de la tolerancia. Existen diferentes vías de aplicación de AIT: oral, subcutánea, sublingual y epicutánea; la vía de aplicación puede proporcionar efectos sinérgicos a la AIT.

La AIT subcutánea (SCIT del inglés *subcutaneous immunotherapy*) es el método más antiguo de aplicación¹⁸⁷, por esta vía se logran inducir mecanismos tolerogénicos como: un incremento controlado por las APC de las poblaciones de Tregs que incrementan la producción de IL-10 y TGF- β ¹⁸⁸. Este método de aplicación está cayendo en desuso pues presenta ciertas desventajas frente a otras vías, como la aversión a las agujas y la capacidad de inducir respuestas sistémicas¹⁸⁹. Para la alergia a alimentos, la efectividad de la SCIT se ha estudiado en dos ensayos clínicos (NCT02382718 y NCT02017626) para la alergia a pescado^{190,191}.

La AIT epicutánea (EPIT del inglés *epicutaneous immunotherapy*), en la cual se aplican los alérgenos directamente sobre la piel¹⁹², asociados o no a parches¹⁹³, la EPIT se ha introducido recientemente y ha obtenido resultados prometedores en modelos animales, al evitar los efectos sistémicos por tener baja vascularización y al producir efectos inmunomoduladores gobernados por células Treg¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Estudios recientes en EPIT para alergia a cacahuete han probado su seguridad y efectividad, observándose cambios significativos en la respuesta inmunológica de los pacientes, con un incremento de la IgG4 específica y una reducción de la activación de los basófilos y de la secreción de citoquinas Th2¹⁹⁷, además de una cierta efectividad clínica¹⁹⁸.

La AIT oral (OIT del inglés *oral immunotherapy*) es probablemente la más estudiada, la pauta de la OIT suele consistir en la toma oral diaria de cantidades pequeñas del alérgeno que van incrementándose hasta alcanzar una fase de mantenimiento, donde

ya se ha alcanzado una cierta desensibilización aunque sin garantizar la inducción de tolerancia¹⁹⁹; la OIT en la alergia a alimentos puede generar una protección parcial en el 80% de los sujetos tratados, induciendo tolerancia completa en un 40% de ellos²⁰⁰. De nuevo, existen estudios para cacahuete, donde ensayos clínicos de OIT han observado mejoras en la respuesta inmunológica, concretamente una reducción de la sensibilidad al alérgeno en las pruebas cutáneas y la cantidad detectada de IgE específica, a la vez que aumentaron el nivel de IgG4 y del número de células T reguladoras¹⁹⁹. Actualmente, la administración para los alimentos y los fármacos de Estados Unidos ha aprobado en 2020 la primera OIT para la alergia al cacahuete (Palforzia) basada en extractos del alérgeno²⁰¹. El principal inconveniente que presenta la OIT es que puede llegar a desencadenar reacciones alérgicas al ir incrementando la dosis de alérgeno^{200,202}.

La alternativa sublingual (SLIT sublingual immunotherapy) despierta especial interés, ya que requiere hasta 1000 veces menos alérgeno y por lo tanto presenta menos riesgos. Además, permite a los antígenos alimentarios interactuar con la mucosa oral, y por lo tanto con el sistema inmunitario asociado; estas estructuras inmunitarias forman parte del anillo de amigdalino y drenan en más de 300 de los 800 nódulos linfáticos del organismo. En condiciones no inflamatorias, estos contactos inducen la tolerancia tal y como se ha descrito en la sección anterior²⁰³. La inmunoterapia sublingual consiste en un tratamiento diario y continuado, durante al menos un año, en el que se coloca unas gotas del extracto alérgico bajo la lengua durante unos minutos para su absorción, y debido a su seguridad, tiene la ventaja de poder ser administrada por el propio paciente en su domicilio²⁰⁴. Se han realizado diversos estudios comparativos entre la SLIT y las otras vías de administración, evaluando la eficacia y la seguridad^{205,206}, donde se comprobó se produce una reducción de los efectos adversos con la SLIT sin embargo el porcentaje de inducción de tolerancia es menor²⁰⁷. En la actualidad, la SLIT con extractos alérgicos se ha aprobado para diversos alimentos de origen vegetal, por ejemplo, kiwi²⁰⁸, cacahuete²⁰⁹ o melocotón²¹⁰. En estas SLIT, al igual que con la OIT, se observaron

mejoras en la sensibilidad cutánea y en la proporción de IgG4e/IgEe. Estudios en SLIT con pacientes alérgicos a melocotón^{210,211} han demostrado que aumenta la tolerancia al alimento, promocionando los mecanismos moleculares y celulares tolerogénicos de las células T reguladoras, que a su vez incrementan la expresión de IL-10 y PD-L1 para aumentar la proporción IgG4e/IgEe. Además, se observa una disminución de la reactividad de los basófilos, el estado de maduración de las células dendríticas y la proliferación de las células efectoras de fenotipo Th2, tanto células T como ILC2.

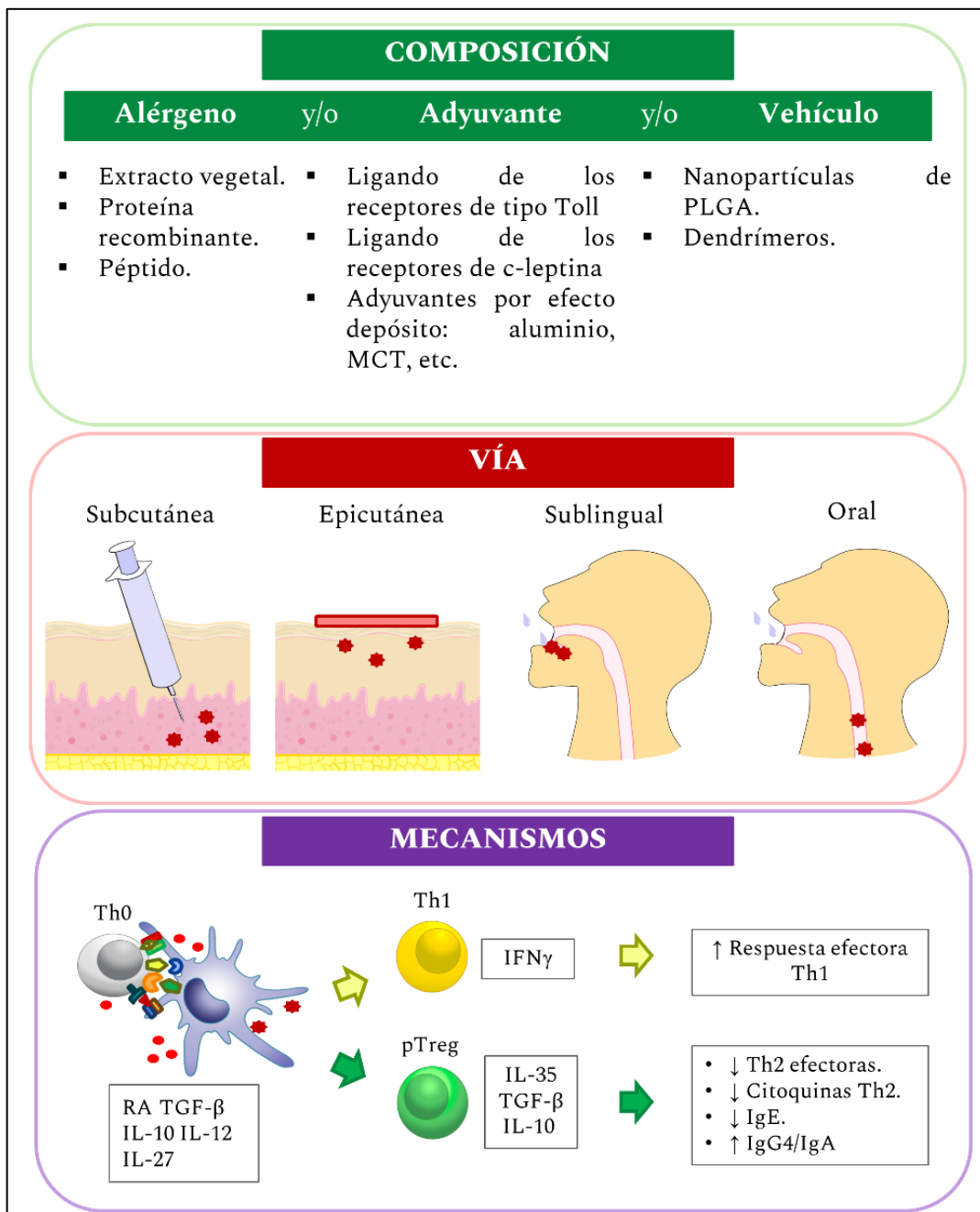


Figura 9. Composición, vías de aplicación y mecanismos moleculares de la AIT.

A pesar de los efectos beneficiosos, las diferentes modalidades de AIT presentan una serie de inconvenientes derivados de su propia esencia, en la utilización de extractos como fuente alergénica: utilización de proteínas alergénicas, dificultad para obtener determinados extractos purificados y la falta de estandarización debida a la variabilidad intrínseca en la composición y contenido alergénico, limita la prevención de efectos adversos o la reproducibilidad de los estudios²¹². Por todo ello se hace patente la necesidad de la generación de nuevas aproximaciones terapéuticas que soslayen estas limitaciones. En la Figura 9 se resumen gráficamente las generalidades y los desarrollos innovadores de la AIT.

4.2.2 Innovaciones terapéuticas

En la actualidad existen distintas líneas de desarrollo e investigación para mejorar la eficacia y seguridad de las AIT. A continuación, se van a desarrollar distintas líneas de trabajo que han conseguido hitos en la mejora terapéutica.

I. Hipoalérgenos o péptidos

El primer elemento que puede optimizarse son los propios alérgenos específicos, ya sea mediante la modificación de su estructura por recombinación o la selección de los epítomos más alergénicos. En base a esto, se sintetizan péptidos específicos que producen una mayor respuesta, incrementando la inducción de la tolerancia, pero conservando e incluso mejorando la seguridad de la inmunoterapia¹⁷¹. Varios ensayos clínicos y estudios han medido la eficacia y la seguridad de distintos alérgenos recombinantes de cacahuete (Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3)²¹³ y de manzana (Mal d 1)²¹⁴. Para los alérgenos recombinantes de Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3 se observó una mejora clínica, al sustituirse el fenotipo Th2 por Th1 en las células T efectoras²¹³. Por otro lado, el estudio con Mal d 1 recombinante obtuvo resultados equivalentes al anterior, al anularse la respuesta mediada por la IgE tras la inmunoterapia²¹⁴. Además, un estudio realizado con una AIT basada en una versión recombinante del alérgeno de melocotón Pru p 3, probó que este es incapaz de

producir una activación completa de los basófilos, en comparación con el alérgeno natural²¹⁵. Sin embargo, en un estudio reciente se ha evidenciado que la versión nativa produce mayores efectos beneficiosos, mediados por IL-10 y IFN- γ , que la versión recombinante²¹⁶.

La inmunoterapia basada en péptidos tiene especial interés, ya que los péptidos conservan suficiente información biológica y estructural en su secuencia de aminoácidos para desarrollar propiedades inmunogénicas propicias para generar una respuesta de tolerancia completa con el contexto inmunológico adecuado desencadenar una respuesta de tolerancia específica de alérgeno, pudiendo ser presentados por las APC y reconocidas tanto por el TCR como el BCR, pero no pueden estimular la degranulación de mastocitos y/o basófilos ya que carecen de los aminoácidos suficientes para el puenteo de uno más IgEe ancladas en los receptores de alta afinidad²¹⁷⁻²¹⁹. Además, permite evitar epítopos poco eficientes o con efectos secundarios no deseados²²⁰. Por ejemplo, en un estudio con pacientes alérgicos a cacahuete se realizó una intervención con un cóctel de 7 péptidos para el alérgeno Ara h 1, gracias a esta mezcla de epítopos se logró alcanzar un máximo de estimulación de las células T sin provocar degranulación en los basófilos de pacientes alérgicos, ya que los péptidos carecen de capacidad para puentear varias moléculas de IgE²²¹. Sin embargo, con el uso de péptidos podemos perder la inmunogenicidad derivada de la configuración terciaria y cuaternaria de una proteína por lo que se necesitarían moléculas que activen el sistema inmunológico.

II. Adyuvantes

Con el fin de optimizar la AIT, el tratamiento puede complementarse con sustancias adyuvantes que permitan superar las limitaciones de seguridad e inmunogenicidad, y que al mismo tiempo tengan capacidad de modular la respuesta hacia una tolerancia inmunológica²²². Para ello, se han descrito diferentes moléculas adyuvantes.

Primero, existen un tipo de adyuvantes que podemos catalogar de adyuvantes de efecto depósito, es decir ejercen su efecto potenciador de la respuesta inmune principalmente por la formación de depósitos del alérgeno, facilitando su captación por las células presentadoras de antígenos²²². Estas sustancias son el hidróxido de aluminio, el fosfato de calcio y la tirosina microcristalina (MCT del inglés *microcrystalline tyrosine*). Los compuestos de aluminio tienen una larga trayectoria como adyuvantes en tratamientos inmunomoduladores, tanto en vacunas como en inmunoterapia²²²⁻²²⁴, sin embargo, presenta una limitación muy importante y es que también pueden favorecer los efectos adversos y el fenotipo Th2 en la respuesta inmunitaria^{222,224,225}. A pesar de tener un uso menos extendido, el fosfato de calcio presenta ventajas interesantes sobre los compuestos de aluminio, como por ejemplo una mayor biocompatibilidad y la incapacidad de inducir la producción de IgE²²⁶, por lo que debería sustituir al hidróxido de aluminio en las formulaciones de vacunas e inmunoterapias. La MCT es una formulación especial del aminoácido L-tirosina producida para que puedan depositarse los inmunógenos, y tiene además un efecto adyuvante probado^{222,227}, es completamente biodegradable y también presenta ventajas sobre el estándar del hidróxido de aluminio^{222,227}, como una reducción de la inducción de IgE, y un incremento de la respuesta Th1 y de la producción de IL-10²²².

El segundo conjunto de moléculas adyuvantes es el que agrupa todas aquellas sustancias que pueden unirse o interaccionar con los receptores del sistema inmune innato que se expresan en las membranas de las células presentadoras de antígeno. Estos ligandos forman parte de los DAMPs y PAMPs, entre los que destacan los ligandos para los receptores de tipo Toll (TLR del inglés *toll-like receptors*) expresados en las APCs, que ante la señalización PAMP-TLR activan múltiples rutas de señalización e inician la respuesta inmune^{222,228}. Otra cualidad de los PAMP, que permite optimizar su función como adyuvante en inmunoterapia, es su selectividad por un tipo de respuesta inmunitaria concreta, los TLR-4 y TLR-9 inducen la respuesta de tipo Th1, y el TLR-2 la

respuesta de tipo Th2^{222,228,229}. Los adyuvantes más importantes de este conjunto son los derivados sintéticos de PAMPs que interactúan con estos TLRs²²². En la alergia a alimentos, se han realizado experimentos en un modelo murino de alergia a cacahuete, donde se utilizó una cadena corta de ADN no metilado (CpG-oligodesoxinucleótidos) capaz de unirse a TLR9 para inducir una respuesta reguladora, esta respuesta se caracterizó por un aumento de IgG2a y una reducción de las citoquinas de tipo Th2, y de la IgE e IgG1 específicas²³⁰⁻²³². Actualmente, los ligandos de otro tipo de receptores presentes en las células presentadoras de antígenos están alcanzando especial relevancia, y son los ligandos de los receptores de tipo lectina de tipo C (CLR del inglés *C-lectin receptor*), especialmente la manosa, que interactúa con el receptor DC-SIGN y promueve las respuestas de tipo Th1 y Treg²³³⁻²³⁵.

III. Nanoestructuras y sistemas combinados

El desarrollo y la aplicación de la nanotecnología viene a resolver muchos de los retos que tienen actualmente las ciencias biomédicas, en este sentido la ciencia de los nanomateriales aporta varias mejoras a la inmunoterapia para la alergia a alimentos. Una primera aportación es que las nanopartículas por su naturaleza pueden ser consideradas adyuvantes ya que pueden interactuar con las APCs y por tanto modular la respuesta inmunitaria^{222,236,237}. Esta interacción con las APCs se produce gracias a las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, por ejemplo, un tamaño de nanopartícula menor a 200 nm favorece la captura por parte de las APCs²³⁸. Además, se ha observado que los nanomateriales con capacidad oxidante favorecen respuestas de tipo Th1, mientras que los antioxidantes favorecen las respuestas Th2²³⁹. En segundo lugar, las nanopartículas también pueden producir efecto depósito, permitiendo controlar la exposición al alérgeno, tanto en tiempo como en localización^{223,240}, incrementando la efectividad y seguridad del tratamiento respectivamente. Además, las nanopartículas permiten proteger a los alérgenos frente a la degradación^{223,236}.

Por otro lado, las nanopartículas se pueden funcionalizar con otras moléculas que proporcionen las características fisicoquímicas deseadas, o con otros ligandos que puedan ejercer efectos inmunomoduladores específicos, por ejemplo, sobre CLR o TLRs expresados en APCs^{236,241}. Estas interacciones entre los grupos funcionales y las APCs facilitan la internalización de las nanopartículas y su procesamiento en los endosomas y lisosomas^{236,242}. La funcionalización de las nanopartículas con ligandos de los TLRs, como por ejemplo con CpG-oligodesoxinucleótidos que favorece una respuesta de tipo Th1 tras su unión a TLR9 en modelos alérgicos²⁴³, muestra mayor internalización y estimulación de las APCs que el adyuvante aislado²³⁶. Esta funcionalización con CpG-oligodesoxinucleótidos ha sido aplicada en un tratamiento de inmunoterapia con nanopartículas unidas a un epítipo alérgico de gamba, la arginina quinasa, donde se observó un incremento de la población de células T reguladoras FoxP3⁺ y de la producción de IL-10; que se acompañó de una reducción de la IgE para la arginina quinasa y de las reacciones anafilácticas²⁴⁴. De igual modo, en un modelo animal, se ensayó un tratamiento de inmunoterapia que combinaba nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico), conjugadas con CpG-oligodesoxinucleótidos y extracto de cacahuete, que produjo un descenso de las citoquinas de tipo Th2 y una subida del IFN- γ ²³¹. También, a las nanopartículas se les pueden añadir ligandos de los CLR, como por ejemplo la manosa, una inmunoterapia oral específica de cacahuete basada en nanopartículas recubiertas con manosa, redujo la gravedad de los síntomas de las reacciones anafilácticas en un modelo animal para esa alergia²⁴⁴.

De entre todas las nanoestructuras estudiadas hasta la fecha, destaca un tipo nanopartículas de forma arborescente que posee unas características óptimas para su aplicación en las inmunoterapias específicas de alérgico, estas nanopartículas se conocen como dendrímeros. Además de carecer de toxicidad²⁴⁵, su estructura ramificada expone en la superficie numerosas terminaciones que pueden ser funcionalizadas con péptidos alérgicos y/o adyuvantes de unión a TLR o CLR; esto permite acumular en

una misma partícula un número igualmente elevado de ligandos, que pueden interactuar con una cuantía equivalente de receptores expresados en la membrana de las células presentadoras de antígenos. Un tipo destacado de dendrímero son los glicodendrímeros de manosa, los cuales una vez funcionalizados con péptidos provenientes de epítomos de un alérgeno, Pru p 3, han demostrado un gran potencial inmunomodulador y favoreciendo su captación por parte de las APCs gracias al receptor CLR DC-SIGN^{246,247}.

4.3 Modelos animales de tolerancia inducida

Para poder realizar estudios exhaustivos que permitan esclarecer los mecanismos que controlan, y dan forma a la sensibilización o la tolerancia en la alergia a alimentos, es necesario generar modelos animales para esta enfermedad. Los modelos animales proporcionan un marco de investigación que permite llevar a cabo estudios y experimentos que no son factibles en humanos por motivos de seguridad, puesto que existe un riesgo alto de provocar reacciones alérgicas graves²⁴⁸. Además, determinados experimentos requieren tener acceso a poblaciones celulares y/o tejidos que son solo accesibles con cirugías invasivas o post mortem. En cuanto a la alergia a alimentos, los modelos animales han permitido evaluar diversas estrategias terapéuticas y dilucidar los mecanismos que subyacen a ésta, así como la identificación de biomarcadores que ayuden a definir el tipo de respuesta²⁴⁹.

En concreto, para ilustrar esto, se va a exponer el desarrollo y desempeño de un modelo animal en la alergia a alimentos. Se trata de un modelo desarrollado en ratón, esta especie es predominante en la investigación de muchas patologías debido a su tamaño, sus ciclos de cría, su manejo y la existencia de múltiples herramientas desarrolladas para manipularlos genéticamente y controlar, molecular y celularmente, su fisiología. En lo que atañe a la alergia a alimentos, es posible inducir bajo condiciones controladas la sensibilización, y eventualmente la tolerancia²⁴⁹. Además, a lo anterior se suma la comprensión exhaustiva que se tiene de su sistema inmunitario, y de las



semejanzas que guarda con los humanos, como por ejemplo la presencia de respuestas Th1 productoras de IgG2, y Th2 productoras de IgE e IgG1^{250,251}. No obstante, también existen discrepancias que afectan a la alergia, principalmente que la IgG1 de ratones también produce la degranulación de mastocitos y basófilos²⁵². También, para salvar el obstáculo que supone establecer la sensibilización oral, en los modelos murinos existen dos cepas, C3H/HeJ y BALB/c, que presentan respuestas Th2 más acentuadas²⁵³ y por lo tanto facilitan la pérdida de tolerancia.

4.3.1 Inmunoterapia sublingual basada en glicodendropéptidos en un modelo murino de anafilaxia a melocotón

La inmunoterapia específica a Pru p 3 es actualmente la alternativa de tratamiento con mejores perspectivas para los pacientes alérgicos al melocotón, por lo que es esencial incorporar las innovaciones descritas en anteriormente, para crear un nuevo tratamiento más seguro y eficiente.

Pru p 3 es el alérgeno más importante del melocotón²⁵⁴, y además es una LTP panalérgica, tanto para alimentos como pólenes^{254,255}, que puede producir reacciones de extrema gravedad, por tanto, en los últimos años para estudiar la efectividad de los tratamientos innovadores se ha desarrollado un modelo murino mediante sensibilización nasal que emula esta sintomatología grave²⁵⁶; la capacidad de este modelo para desarrollar anafilaxia se confirmó por marcadores *in vivo* e *in vitro*²⁵⁶. Para inducir tolerancia en el modelo se administró una SLIT basada en glicodendrimeros monoméricos funcionalizados con péptidos de Pru p 3, correspondientes a epítomos lineales reconocibles por los TCR, y con 9 moléculas de manosas²⁴³; este glicodendropéptido se denominó D1ManPrup3. La SLIT a dos concentraciones distintas, 2 nM y 5 nM, protegió a los ratones contra exposiciones a Pru p 3. Sin embargo, a 5nM se alcanzó un estado de desensibilización temporal, mientras que a 2 nM se indujo una respuesta tolerante completa, que proporcionó protección a largo plazo frente a Pru p 3

sin la necesidad de exposiciones continuas ni a la SLIT ni al alérgeno²⁵⁷. Esta respuesta tolerante se caracterizó además por una reducción de las células productoras de IgE e IgG1 específicas a Pru p 3, y por un descenso de la producción de IL-4, a la vez que se incrementaron las células T reguladoras FoxP3⁺, la producción de IL-10 y de IFN- γ ²⁵⁷. Este modelo experimental en el que dependiendo de la concentración del glicodendropéptido se genera una desensibilización o una respuesta de tolerancia es una gran herramienta para analizar los biomarcadores diferenciales de respuesta a la AIT, que son esenciales a la hora de la toma de decisiones por parte del personal clínico.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

5. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en el estudio de las alergias a alimentos

La irrupción de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS del inglés *next generation sequencing*) ha revolucionado el modo en que se aborda la investigación en las ciencias biomédicas^{258,259}. Estas aproximaciones han permitido la identificación de múltiples marcadores de diagnóstico o de respuesta al tratamiento en diferentes procesos patológicos^{258,259}.

Esencialmente, este conjunto de técnicas permite registrar masivamente un conjunto amplio de fragmentos de ADN purificados presentes en una muestra, para estudiar desde las variantes genéticas del genoma de un individuo hasta los transcritos expresados en un cultivo celular, pasando por el epigenoma de células tumorales; lo que convierte a este conjunto de técnicas en un aliado invaluable para desentrañar los mecanismos celulares y moleculares que caracterizan al sistema inmunitario²⁶⁰. En los últimos años, estos procedimientos han contribuido al estudio de la alergia a los alimentos con aportes como: la asociación de variantes genéticas del factor de transcripción STAT6 con el desarrollo de la alergia a alimentos²⁶¹ mediante secuenciación de ADN nuclear, y la identificación mediante secuenciación de ARN, de genes como *NFKBIA*, *ARG1*, *PHACTR1* y *ZNF121*, cuyos cambios de expresión se relacionan con la gravedad de las reacciones alérgicas al cacahuete²⁶². Incluso, implementaciones más innovadoras permiten estudiar simultáneamente todas las subpoblaciones de células T específicas para el alérgeno tras una OIT a cacahuete²⁶³.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, la alergia a alimentos es una patología en auge que afecta hasta un 3,28% de la población adulta española¹⁶, principalmente a alimentos de origen vegetal. De entre estos destacan las rosáceas²⁴, y concretamente LTPs como los agentes causantes más frecuentes en el área mediterránea²⁶⁴; siendo Pru p 3, el alérgeno mayor del melocotón, la LTP con mayor prevalencia²⁶⁴. Reducir el tratamiento de la alergia a LTPs únicamente a la evitación del o de los alimentos implicados puede ser problemático, porque es frecuente encontrar pacientes con un patrón complejo de sensibilización a múltiples LTPs y algunos pólenes, que está causado por la alta reactividad cruzada de estos panalérgenos y que se conoce como síndrome LTP¹¹¹. Dicho síndrome LTP incrementa el número de exposiciones accidentales, lo que puede tener consecuencias graves ya que las LTP provocan reacciones sistémicas en un 30% de los pacientes²⁶⁴, y por tanto afecta enormemente a la calidad de vida de los pacientes^{112,265}. Debido a esto, la inducción de tolerancia mediante inmunoterapia alérgeno-específica es la única alternativa de tratamiento segura y efectiva, como se ha probado en estudios previos^{211,266}, donde está demostrado que una inmunoterapia sublingual con Pru p 3 incrementó la tolerancia de pacientes alérgicos a melocotón. No obstante, sigue habiendo limitaciones en cuanto a su seguridad y existiendo interrogantes sobre su efectividad a largo plazo. Por esto y por tratarse de un proceso costoso y largo en el tiempo, es necesario estudiar los mecanismos inmunitarios, celulares y moleculares que subyacen a la tolerancia inducida. Es de especial importancia conocer los biomarcadores pronósticos de cada tipo de respuesta al tratamiento fundamentalmente en fases tempranas del mismo para evitar su mantenimiento de forma innecesaria.

En esta búsqueda de biomarcadores, la presente Tesis Doctoral se ha centrado en un modelo de inmunoterapia sublingual alérgeno-específica para Pru p 3 que contiene una nanoestructura dendrímica funcionalizada con manosas y un epítipo lineal de Pru p 3 (D1ManPrup3)²⁵⁷. El tratamiento con este glicodendropéptido (GDP) consiguió prevenir la anafilaxia ante una exposición a Pru p 3 en un modelo murino de anafilaxia a

este alérgeno²⁵⁶. A nivel inmunológico, celular y molecular, se observó que esta terapia induce una respuesta reguladora elevando el número de células Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) e IL-10, en una respuesta tolerante orquestada por las células dendríticas, donde se observó por citometría de flujo un descenso en la expresión de diversos biomarcadores de activación y un aumento de PD-L1²⁶⁷.

Un hecho interesante fue la observación en este modelo de que utilizando dos concentraciones de GDP, 2nM y 5nM de D1ManPrup3, se generaron dos respuestas protectoras: una respuesta de desensibilización temporal y una respuesta de tolerancia sostenida en el tiempo²⁵⁷. Gracias a este hallazgo, se generó un marco experimental propicio para investigar los procesos, celulares y moleculares, que determinan el desenlace de la inmunoterapia a largo plazo. Previamente, se han descrito diferencias inmunológicas entre ambos estados. La respuesta tolerante se caracteriza por presentar niveles superiores de IL-10 y de células T reguladoras FoxP3⁺ a la respuesta desensibilizadora²⁵⁷. No obstante, los estudios realizados hasta el momento se han caracterizado por explorar un conjunto conocido de marcadores inmunológicos, principalmente citoquinas y receptores de membrana; este tipo de experimentos limita considerablemente la búsqueda de nuevos biomarcadores y la dilucidación de los mecanismos implicados en la respuesta de tolerancia inducida por inmunoterapia.

Por lo tanto, es necesario conducir nuevas investigaciones aplicando técnicas más exploratorias, sensibles y masivas, que arrojen luz sobre las cuestiones que rodean a la adquisición de la tolerancia a los alimentos, sobre los mecanismos que la soportan y sobre los agentes que la gobiernan. En última instancia, los frutos de estos esfuerzos contribuirán al descubrimiento de nuevas rutas de intervención inmunomoduladora, al diseño de nuevas terapias, al discernimiento entre buenas y malas respuestas durante el proceso de la inmunoterapia, en definitiva, a la mejora de la calidad de vida de los pacientes alérgicos a los alimentos.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

OBJETIVOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Objetivos generales

1. Estudiar los mecanismos inmunológicos inductores de la tolerancia promovidos por la inmunoterapia alérgeno-específicas para identificar potenciales biomarcadores en la modulación de la respuesta alérgica a alimentos de origen vegetal.

Objetivos específicos

1. Estudiar los mecanismos propios de las células dendríticas que están implicados en la adquisición de la tolerancia inducida por inmunoterapia sublingual con D1ManPrup3 en un modelo experimental de anafilaxia a melocotón.
 - a. Estudiar los cambios producidos en la expresión génica tras la inmunoterapia en células dendríticas de ganglios linfáticos mediante secuenciación de ARN (RNA-seq).
 - i. Analizar las diferencias de expresión génica entre los estados de desensibilización temporal y tolerancia a largo plazo.
 - b. Estudiar la regulación epigenética por metilación del ADN tras la inmunoterapia en células dendríticas de ganglios linfáticos mediante secuenciación del genoma completo modificado con bisulfito (WGBS-seq).
 - i. Analizar las diferencias de regulación epigenética entre los estados de desensibilización transitoria y tolerancia a largo plazo
2. Estudiar los mecanismos propios de las células Treg implicados en la adquisición de la tolerancia inducida por inmunoterapia sublingual con D1ManPrup3 en un modelo experimental de anafilaxia a melocotón mediante un estudio de la metilación del ADN (WGBS-seq).
 - a. Analizar las diferencias de regulación epigenética entre los estados de desensibilización transitoria y tolerancia a largo plazo.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Para estudiar los mecanismos inmunológicos que participan en la tolerancia inducida por inmunoterapia sublingual en un modelo animal de anafilaxia a Pru p 3, se han realizado tres experimentos de secuenciación masiva de ácidos nucleicos. Para poder discernir las causas del efecto tolerogénico del tratamiento, los experimentos se han realizado sobre cuatro grupos de ratones que representan distintos tipos de respuesta inmunológica tras la exposición a Pru p 3.

Los tres primeros grupos los constituyen ratones sensibilizados con Pru p 3 y LPS, que por tanto pueden desarrollar anafilaxia al exponerse a Pru p 3²⁵⁶; además, cada uno de estos tres grupos recibe un tratamiento diferente para representar los tres tipos de respuestas a la inmunoterapia, y son: no tratados o anafilácticos (grupo Anafilaxia), desensibilizados temporalmente (grupo Desensibilizado) y tolerantes a largo plazo (grupo Tolerante), habiendo recibido tampón fosfato salino (PBS) 1X, D1ManPrup3 5 nM, y D1ManPrup3 2 nM respectivamente²⁵⁷.

El último grupo lo forman ratones sensibilizados únicamente con Pru p 3 que no desarrollan anafilaxia por exposición a Pru p 3²⁵⁶. Al igual que los ratones del grupo Anafilaxia, este grupo sensibilizado solo con Pru p 3 son tratados con PBS durante la inmunoterapia; este grupo de ratones representa a los individuos que de forma natural están sensibilizados a Pru p 3 pero no desarrollan síntomas alérgicos a este alérgeno (grupo Alérgeno-solo). Este fenotipo sensibilizado no alérgico constituye hasta un 70% de la población infantil²⁴, y es esencial su inclusión para conocer los procesos inmunológicos tolerogénicos inducidos específicamente por la inmunoterapia. El diseño de estos experimentos se recoge en la Figura 10 y la Tabla 3.

Tabla 3 – Grupos experimentales del estudio

Grupo	Sensibilización	Tratamiento	Fenotipo
	n		
	¿Anafilaxia?	¿Protección?	
Anafilaxia	LPS + Pru p 3	PBS	Alérgico
	SÍ	NO	
Desensibilizado	LPS + Pru p 3	D1ManPrup3 5nM	Desensibilizado transitoriamente
	SÍ	CORTO PLAZO	
Tolerante	LPS + Pru p 3	D1ManPrup3 2nM	Tolerante
	SÍ	LARGO PLAZO	
Antígeno-solo	Pru p 3	PBS	Sensibilizado no alérgico
	NO	SÍ	

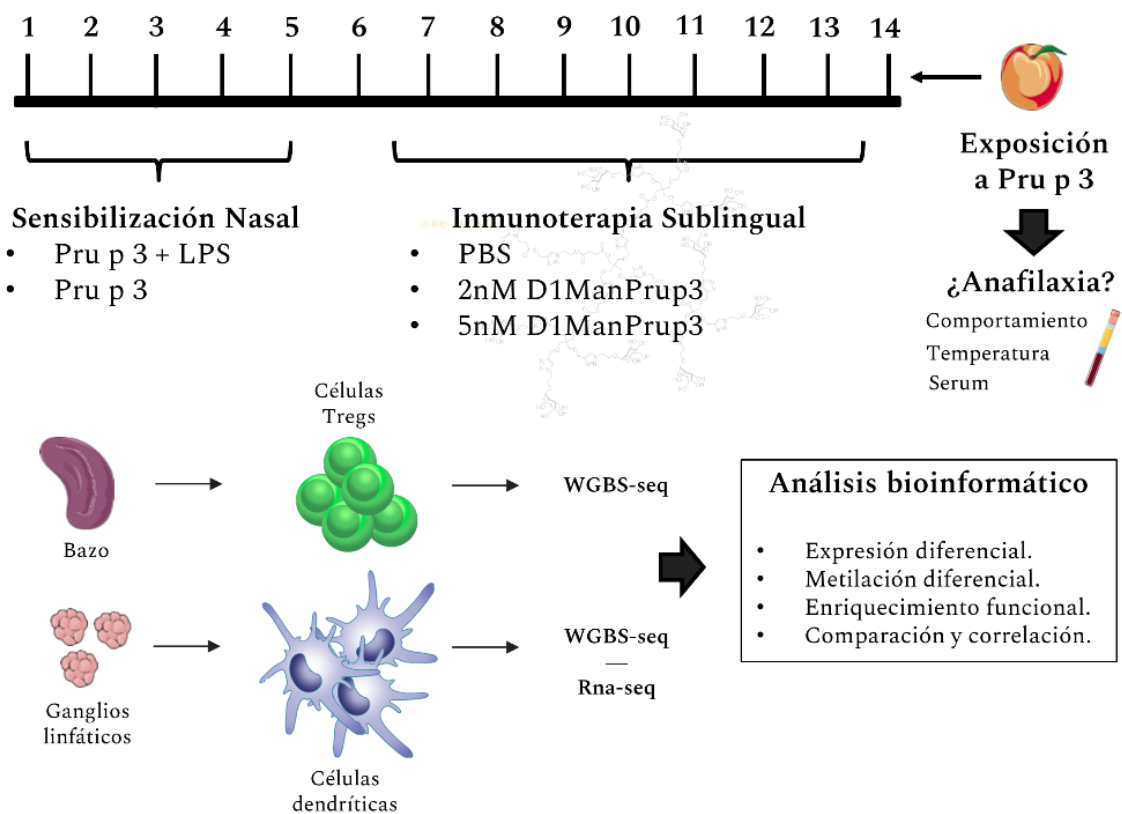


Figura 10. Diseño de la inmunoterapia en un modelo de anafilaxia y de los estudios de secuenciación masiva.

Además, los experimentos de secuenciación se han realizado con ácidos nucleicos extraídos de células T reguladoras y células dendríticas. Estas dos poblaciones, como se ha expuesto anteriormente en este trabajo, tienen un rol esencial en el establecimiento

de la tolerancia a los alimentos. Estas células, se aislaron de los ganglios linfáticos y del bazo tras una exposición intraperitoneal a Pru p 3, la cual se realizó una semana después de finalizar la inmunoterapia. En ese punto temporal, ambos grupos, Desensibilizado y Tolerante, mantuvieron la protección a Pru p 3²⁵⁷. Gracias a esto, se pueden estudiar las diferencias existentes en la protección frente a Pru p 3 entre los estados de desensibilización transitoria y la tolerancia a largo plazo. Lo que, en último lugar, proporciona potenciales biomarcadores de respuesta o efectividad del tratamiento.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Mecanismos propios de las células dendríticas regulados por la SLIT con D1ManPrup3

a. Estudio de la expresión diferencial

El primer estudio consistió en un experimento de RNA-seq con el ARN aislado de células dendríticas obtenidas de ganglios linfáticos, y en su correspondiente análisis bioinformático de la expresión génica diferencial²⁶⁸. El análisis de la expresión diferencial comparó el transcriptoma promedio de los animales anafilácticos (Anafilaxia) con el de los grupos tratados: desensibilizados (Desensibilizado) y tolerantes (Tolerante); así como los sensibilizados únicamente con el alérgeno (Alérgeno-solo) y no anafilácticos. Esta comparación arrojó los siguientes resultados (Tabla 4 y Figura 11): se hallaron 411 genes expresados diferencialmente (DEG del inglés *differentially expressed genes*) para el grupo Alérgeno-solo, 186 para el grupo Tolerante y 119 para el grupo Desensibilizado; los cuales eran mayoritariamente genes infraexpresados, es decir, que presentaban mayor expresión en el grupo Anafilaxia; a excepción del grupo Desensibilizado donde encontraron un número similar de genes sobreexpresados e infraexpresados.

Tabla 4 - Tabla resumen de la expresión diferencial.

Genes expresados diferencialmente	Antígeno-solo vs Anafilaxia	Tolerante vs Anafilaxia	Desensibilizado vs Anafilaxia
Todos	411	186	119
Sobreexpresados	49	63	62
Infraexpresados	362	123	57
Top 10 (por p-valor ajustado)	<i>Bhlhe40, Dusp5, Tnfaip3, Nr4a2, Rgs1, Fosl2, Nr4a3, Atf3, Trib1, Mapk11</i>	<i>Stk17b, Gpr171, Vps37b, Foxl2, Tnfaip3, P2ry10, B3gnt7, Cd83, Dusp5, Thbs1</i>	<i>Mapk11, B3gnt7, Vps37b, Nfkbid, Fam107b, Ifngr1, Tex2, Cytip, Mettl17, Thbs1</i>

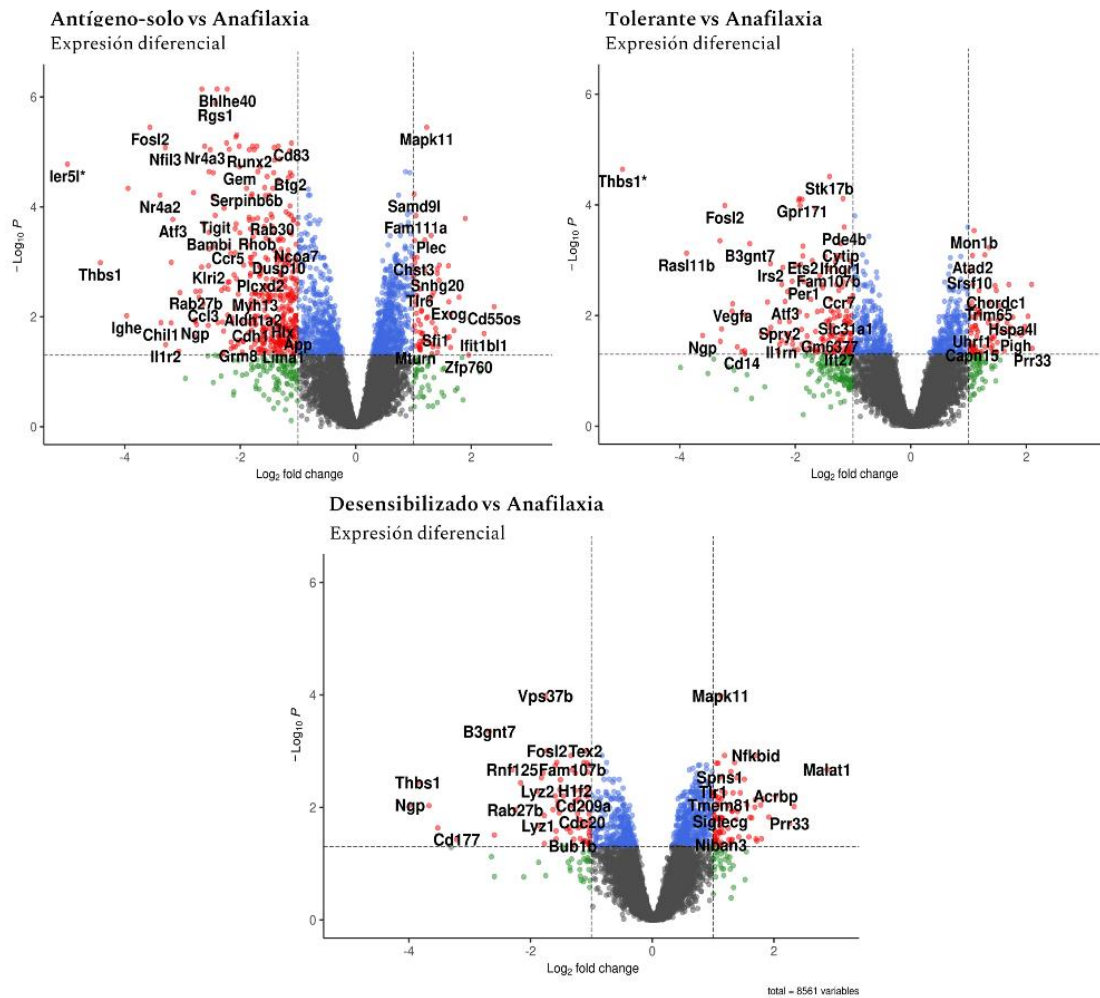


Figura 11. Gráficos de volcán para los tres análisis de expresión diferencial.

Estos patrones de expresión diferencial concuerdan con el fenotipo protector a largo plazo, donde se detectaron un mayor número de DEGs en el grupo Tolerante que en el grupo Desensibilizado (186 contra 119), esta diferencia cuantitativa emerge especialmente del conjunto de los genes infraexpresados (123 contra 57); lo cual, podría interpretarse como una consecuencia de una pérdida progresiva del efecto protector de la inmunoterapia en el grupo Desensibilizado. Esta diferencia cuantitativa se ve reforzada por el bajo número de DEGs comunes a ambos grupos (36), a pesar de haber recibido ambos el mismo tipo de inmunoterapia y mostrar un fenotipo similar ante la exposición a Pru p 3 una semana después de haber concluido el tratamiento. Sin embargo, 29 de estos DEGs (Figura 12) se detectaron en las tres comparaciones realizadas contra el grupo de Anafilaxia, estos DEGs se podrían considerar un núcleo de genes

relacionados con la ausencia de respuesta, por ejemplo, algunos DEGs infraexpresados, como *Il12b* y *Ifngr1*, al reprimirse aumentan la actividad de la IL-12 y promueven un fenotipo Th1 en la respuesta a Pru p 3^{269,270}. Otros DEGs infraexpresados de este núcleo, *Thsb1*, *Prdm1*, *Nr4a3*, junto a *Ifngr1*, se relacionaron con una ausencia, en las células dendríticas, de maduración y de secreción de diversas citoquinas proinflamatorias²⁷¹⁻²⁷⁴. Además, dos factores de transcripción proinflamatorios de la familia AP-1, *Fosl2* y *Cebpb*, se encontraron menos expresados que en el grupo de animales anafilácticos^{275,276}.

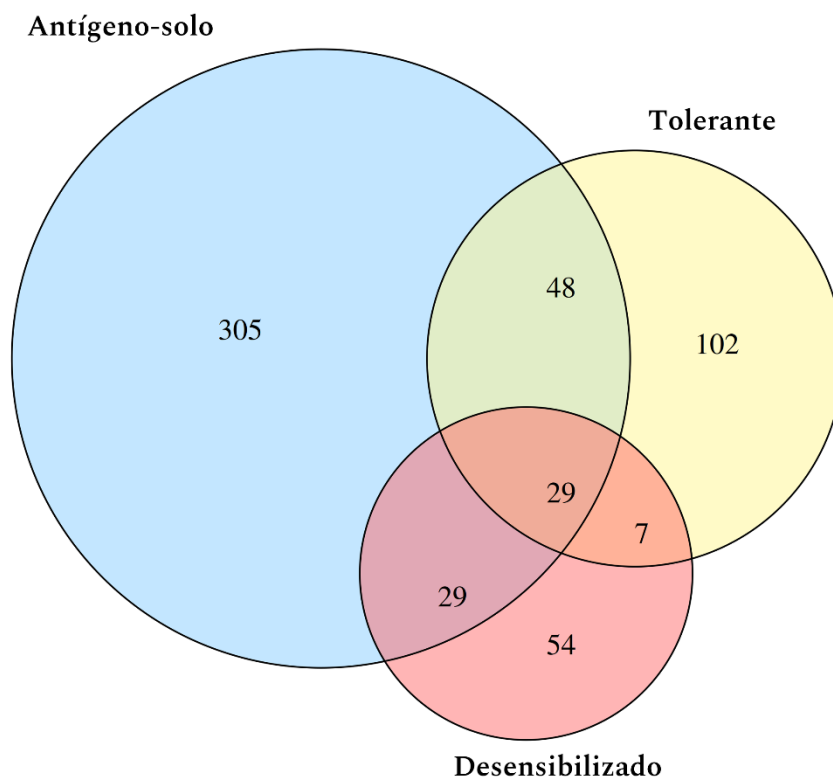


Figura 12. Diagrama de Venn para las listas de genes expresados diferencialmente obtenidas en el estudio.

Más aún, los 102 DEGs detectados únicamente en la comparación con el grupo Tolerante tienen especial relevancia, ya que estos pueden tener una función importante en la inducción de la tolerancia al alérgeno. Este conjunto incluye un grupo de genes infraexpresados que se asocian a la activación de las células dendríticas, y por lo tanto una menor expresión puede habilitar el comportamiento tolerogénico, como los

marcadores clásicos *Ccr7*²⁷⁷ y *Cd83*²⁷⁸, y también *Cxcr4*²⁷⁹, *Cytip*²⁸⁰, *Il6st*²⁸¹, *Rel*^{282,283}, *Smad7*^{284,285}, *Pde4b*²⁸⁶, *Zbtb10*²⁸⁷ (ref282), *Sik1*²⁸⁸ y *Tnfaip3*^{289,290}.

Otro conjunto de DEGs exclusivos del grupo Tolerante que tiene especial interés, es el compuesto por una serie de genes sobreexpresados que tienen documentada su participación en la respuesta tolerante, como por ejemplo, *Alg3*²⁹¹, *Il2ra*²⁹² y *Uhfr1*^{293,294}. Es importante destacar que este grupo de DEGs incluyó una serie de co-chaperonas, *Hsph1*²⁹⁵, *Hsp90aa1*²⁹⁶ y *Stip1*²⁹⁵, que participan en el procesamiento y presentación de antígenos en las respuestas tolerantes. También, se detectó una mayor expresión del gen *Dgcr8*²⁹⁷, que participa en la producción de micro ARNs, los cuales tienen un papel en la regulación del comportamiento de las células dendríticas²⁹⁷.

La señalización de la proteína mTOR tiene un papel esencial en el cambio del fenotipo inflamatorio a tolerante de la respuesta de las células dendríticas^{298,299}, observando que su activación en las células dendríticas, una vez presentes en los nódulos linfáticos, induce la respuesta tolerante^{298,299}. En este sentido, múltiples DEGs detectados en la comparación de los animales tolerantes contra los animales anafilácticos apuntan también hacia esa activación de la ruta de señalización de mTOR en los nódulos linfáticos, por ejemplo, *Nuak1*, un DEG sobreexpresado en tolerantes que activa a mTOR en respuesta a calcio³⁰⁰. Este gen se encuentra regulado por otro DEG sobreexpresado, *Maf*, el cual promueve, mediante la activación de mTOR, la secreción de IL-10 tras la señalización de TLR4³⁰¹. Es más, otro DEG sobreexpresado en los animales tolerantes, *Cebpg*, activa la señalización mTOR y promueve el comportamiento tolerogénico de las células dendríticas²⁷⁶. Adicionalmente, se encontraron infraexpresados los genes *Ddit4*³⁰², *Pik3ip1*³⁰³, *Mpc2*³⁰⁴ y *Sesn1*³⁰⁵, que codifican inhibidores de la señalización de mTOR. No obstante, otros DEGs exclusivos del grupo Tolerante indican lo contrario, por ejemplo, varios inhibidores de mTOR sobreexpresados: *Neil3*³⁰⁶, *Arl4d*³⁰⁷ y *Gpr68*³⁰⁸.

Por otro lado, la expresión diferencial exclusiva de la comparación con el grupo Desensibilizado puede ilustrar cómo se podría inducir la protección a corto plazo. La

mayoría de ellos se detectaron como DEGs sobreexpresados, incluyendo *Nfkbid* y *Tnf*, *Nfkbid*, que limitan la inflamación mediante la inhibición de la señalización NF- κ B³⁰⁹, y el gen *Tnf* codifica una citoquina proinflamatoria que puede inducir a las células dendríticas a activar de la producción de IL-10 por parte de las células T³¹⁰. La expresión de *Tnf*, junto a la de la IL-6 y la IL-1, se regula por la señalización de mTOR²⁹⁹. En este mismo sentido, aparecieron sobreexpresados dos DEGs cuya expresión se induce por la actividad de mTOR, concretamente *Malat1*³¹¹, que favorece el fenotipo tolerogénico de las células dendríticas³¹², y *Egr2* que, por el contrario, puede estar relacionado con la pérdida de la protección en semanas sucesivas y el desarrollo de una respuesta de tipo Th2³¹³⁻³¹⁶. Asimismo, otros tres DEGs sobreexpresados activan la ruta de señalización de mTOR por diversas vías: *Zfp692* activando la señalización PI3K/AKT^{317,318}, *Hes1* reprimiendo PTENT³¹⁹, y *Mapk11* que actuando directamente sobre la ruta de mTOR^{320,321}. Además, la infraexpresión exclusiva en el grupo Desensibilizado de otros tres DEGS puede relacionarse con la desensibilización transitoria y la pérdida de la protección; el DEG *Camp* codifica un péptido antimicrobiano que reduce la activación del TLR, y que se ha asociado a la respuesta en la alergia por contacto³²². *Cd209a* codifica el receptor CLR DC-SIGN, este receptor participa en la inducción de la tolerancia, es interesante encontrar una infraexpresión de este receptor, ya que participa en la detección de las manosas del D1ManPrup3^{246,247}, y porque la encontramos diferencialmente expresado únicamente a la dosis más alta aplicada (5 nM). Por último, el gen *Ahr*, se ha observado que su deficiencia favorece las respuestas Th2³²³, ya que codifica el receptor de los hidrocarburos arílicos que detecta los ácidos grasos de cadena corta producidos por la microbiota y que promueven la tolerancia.

El estudio de la expresión diferencial ha probado que la inmunoterapia a dos concentraciones, que genera dos fenotipos diferentes a largo plazo, induce distintos mecanismos inmunomoduladores en las células dendríticas, en los que parece tener especial protagonismo la ruta de señalización mTOR. Además, estas diferencias han

permitido conocer potenciales biomarcadores que determinan el éxito de la inmunoterapia específica de alérgeno, como, *Tnfaip3*, *Il2ra*, *Smad7*, *Rel*, *Mad*, *Cebpg*, *Malat1*, *Ccr7*, *Cd83*, etc. Sin embargo, este tipo de experimentos ofrecen una un punto temporal fijo del transcriptoma, y por lo tanto debe considerarse en experimentos futuros explorar las diferencias de expresión a diversos tiempos, antes y después de la exposición. Una alternativa a esto es explorar los cambios epigenéticos que condicionan la expresión, ya que perduran más en el tiempo y permiten establecer marcadores más estables, además de ayudar a descubrir sobre los efectos de la inmunoterapia sobre las células del sistema inmunitario.

b. Estudio de metilación diferencial en regiones promotoras

En el segundo experimento de secuenciación, se estableció el objetivo de estudiar la regulación epigenética de las células dendríticas de ganglios linfáticos tras la exposición de los ratones a Pru p 3, complementando el experimento anterior de RNA-seq. Concretamente, se estudió la metilación del ADN, que forma parte de los mecanismos de regulación epigenética y que se ha observado que puede tener un rol en la patogénesis de la alergia a alimentos³²⁴, y también en la inmunomodulación³²⁴; la metilación del ADN se estudió mediante WGBS-seq. Esto permitió estudiar los cambios de metilación que aparecen tras la inmunoterapia en las regiones promotoras de genes esenciales para la respuesta tolerante, y también en aquellos genes que se asocian a la desensibilización transitoria, estableciendo la oportunidad de desarrollar nuevos biomarcadores predictivos de la respuesta a la inmunoterapia³²⁵. Más específicamente, se analizó el genoma completo de los ratones con un algoritmo de ventana deslizante seleccionando después las ventanas solapantes con los promotores génicos que presentaran diferencias significativas de metilación entre el grupo Anafilaxia y los grupos Tolerante, Desensibilizado y Alérgeno-solo. Estas ventanas constituyeron las regiones promotoras diferencialmente metiladas (DMPR del inglés *differentially methylated promoter regions*)³²⁵. Primero, en el análisis de metilación diferencial, el menor

número de DMPRs se detectó en el grupo Alérgeno-solo (3.391), seguido por el Tolerante (4.091 y finalmente por el grupo Desensibilizado (7.713) (Tabla 5).

Tabla 5 - Tabla resumen de la metilación diferencial en regiones promotoras

Regiones promotoras diferencialmente metiladas	Antígeno-solo vs Anafilaxia	Tolerante vs Anafilaxia	Desensibilizado vs Anafilaxia
Todas	3.931	4.091	7.713
Hipermetiladas	2.068	2.726	6.181
Hipometiladas	1.863	1.365	1.532
Genes afectados	3.713	3.863	6.959

El número de DMPRs se correlacionó inversamente con la tolerancia a Pru p 3 a largo plazo, y se intuye que cada uno de los grupos alcanzó la protección por distintos mecanismos, pues mostraron un paisaje de metilación propio, tan solo se encontraron 466 genes afectados por la metilación diferencial en las tres comparaciones. En esta misma línea, en los grupos que recibieron inmunoterapia con D1ManPrup3, se hallaron 1.512 genes afectados comunes a ambas comparaciones (Figura 13), estas últimas DMPRs podrían regular la expresión de genes relacionados con mecanismos comunes inducidos por la inmunoterapia, independientemente de la concentración aplicada.

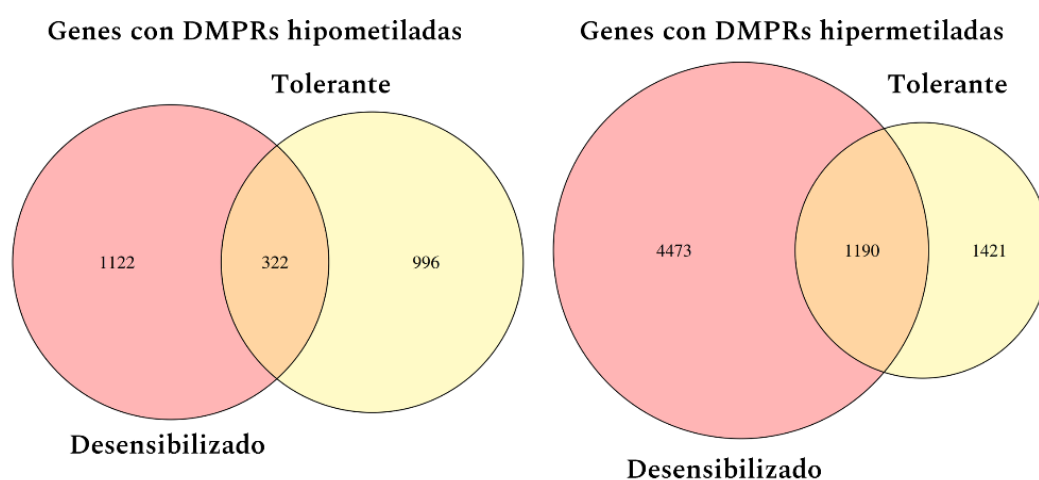


Figura 13. Diagramas de Venn para las listas de DMPRs hipometiladas e hipermetiladas detectadas en los grupos Tolerante y Desensibilizado.

Estas DMPRs comunes a los grupos tratados con SLIT, afectan a genes involucrados en la respuesta Th1 como: *Il12b*, *Ifng*, y *Ifngr2*³²⁶⁻³²⁸, a diversas citoquinas proinflamatorias y receptores de estas como: *Il1a*, *Il1b*, *Il2*, *Il17*, *Il24*, *Il33*, *Litaf*, y *Tnf*^{260,329-334}, a genes relacionados con la presentación de antígenos en el MHC II como: *H2-DMA*, *H2-Ke6*, *H2-Eb2*, y *H2-Q5*³³⁵, y a factores de transcripción que afectan a la función inmunitaria como: *Maf*, *Junb*, *Nr4a3*, y *Gata3*^{274,336-338}. Estos cambios están en sintonía con los demostrados previamente en el estudio de RNA-seq, pues igualmente se observa la promoción de las respuestas Th1 y Treg, que caracteriza a la protección a Pru p 3²⁶⁸. Esta correlación entre ambos estudios se concretó en una serie de genes de especial interés, por ejemplo, *Il12b* que se detectó como infraexpresado en los grupos Tolerante y Desensibilizado, lo cual podría implicar un aumento de la actividad de la IL-12 y por tanto de la respuesta Th1²⁶⁹. En este estudio se encontraron 2 DMPRs hipermetiladas en el promotor de este gen para el grupo Desensibilizado, y una DMPR hipermetilada para el Tolerante²⁶⁸. Más aún, se encontró una DMPR hipermetilada para el grupo Tolerante, y otra DMPR hipermetilada para el Desensibilizado, en el promotor gen *Il18r1*, pero solo se detectó una expresión diferencial para este gen en el grupo Tolerante²⁶⁸, lo que puede haberse producido debido a las diferencias de localización, tamaño y magnitud entre ambas DMPRs. El receptor codificado por el gen *Il18r1* se ha relacionado con un aumento de la respuesta de tipo Th1³³⁹, y puede tener propiedades tanto antiinflamatorias como proinflamatorias³⁴⁰. Aunque su papel mecánico en este modelo de tolerancia inducida no está claro, puede ser considerado un potencial biomarcador junto a la *Il12b* al haberse encontrado diferencias a nivel de expresión y metilación. Sin embargo, al igual que los genes expresados diferencialmente, las regiones más interesantes y con mayor potencial son aquellas relacionadas únicamente con un fenotipo protector.

Se encontraron 5.596 DMPRs para la comparación entre el grupo Desensibilizado y el grupo Anafilaxia en promotores inalterados en las otras condiciones, de estas DMPRs, un conjunto de regiones hipermetiladas pueden influenciar la activación de las

células dendríticas. Por ejemplo, se encontraron DMPRs en los genes de los receptores de tipo Toll, *Tlr4*, *Tlr3*, *Tlr8*, y *Tlr5*, en genes involucrados en la producción de IL-2, *Cd247*, *Irf4* y *Pde4b*³⁴¹, y otras citoquinas como la *Il27*³⁴², *Il7*³⁴³, e *Il15*^{344,345}. Si se asume una relación canónica entre el aumento de la metilación en el contexto CpG de los promotores y la expresión del gen, estas DMPRs reducirían la actividad proinflamatoria de las células dendríticas. También se detectaron otras DMPRs hipermetiladas que podrían tener un efecto biológico opuesto, cómo serían las DMPRs en los genes *Il10ra* y *Pten*, que potencialmente pueden reducir la señalización de la IL-10³⁴⁶ y la señalización mTOR tolerogénica²⁹⁹, respectivamente. Aunque, las DMPRs hipermetiladas más relevantes detectadas son las que afectaron a los genes *Cd209a*, *Cebpb*, y *Tnf*, los cuales se detectaron como DEGs en el estudio anterior²⁶⁸. Los dos primeros se observaron como infraexpresados, *Cd209* codifica el receptor de manosas DC-SIGN^{103,347}, y *Cebpb* produce un factor de transcripción proinflamatorio²⁷⁶. El gen *Tnf*, que codifica al TNF- α , se halló como DEG sobreexpresado exclusivamente para el grupo Desensibilizado, y en su promotor se detectaron para este grupo dos DMPRs, una hipermetilada y otra hipometilada. Los cambios de metilación, y de expresión, de los dos primeros genes pueden estar vinculados con la protección característica de los desensibilizados, mientras que el *Tnf* se puede vincular con la pérdida de protección en el grupo de Desensibilizado D1ManPrup3, ya que se relaciona con diversas rutas de señalización proinflamatorias, aunque también en función del contexto puede estimular la producción de IL-10³¹⁰.

Del mismo modo que para el grupo Desensibilizado, para la comparación del grupo Tolerante se detectaron 2.417 DMPRs exclusivas, incluyendo múltiples DMPRs hipermetiladas que se situaron en los promotores de genes como la citoquina Th2 *Il13*³⁴⁸, como los componentes del MHC-II *H2-Oa*, *H2-Q1*, y *H2-T23*³³⁵, como el receptor accesorio de la IL-18, *Il18rap*, que regula la unión de alta afinidad de la IL-18³⁴⁹, y como *Il23a*, que codifica una subunidad de la interleuquina 23 (IL-23), una citoquina que

participa en la promoción de las respuestas Th17 (IL-23)³⁵⁰. Incluso, se detectó una DMPR hipermetilada en el promotor del gen que codifica la subunidad alfa del receptor de alta afinidad de la IgE (*Fcer1a*), el cual es esencial en el desarrollo de la respuesta efectora cuando se expresa en mastocitos y basófilos. Aunque, se ha documentado que incrementa la capacidad de las APC de presentar el antígeno a las células T³⁵¹; además, ya ha sido propuesto como potencial biomarcador para la efectividad de las inmunoterapias alérgeno-específicas³⁵². Además, las DMPRs hipermetiladas afectaron también a genes vinculados a la maduración de las células dendríticas y a su actividad proinflamatoria, por ejemplo, *Jun* un miembro de familia de factores de transcripción proinflamatorios AP-1³³⁸, y *Cd86* que codifica una proteína de la familia B7 que interacciona con CD28 o CTLA4 en la membrana de los linfocitos T³⁵³. También se hallaron dos DMPRs hipometiladas que merecen especial atención porque afectaron a promotores de genes expresados diferencialmente en el estudio de RNA-seq²⁶⁸, el primero gen afectado es *Ahsa2*, un DEG sobreexpresado que produce una co-chaperona activadora de Hsp90, cuya activación tiene un efecto promotor de la respuesta Th1, ya que favorece la secreción de IL-12^{296,354}. Y por último, otra DMPR hipometilada se situó en el promotor del gen *Maf*, un factor de transcripción de la familia AP-1 controlado por la proteína mTOR, que controla las acciones tolerogénicas de los linfocitos³⁵⁵, y la respuesta reguladora de la inflamación por parte de las células dendríticas tras la señalización por el TLR4³⁰¹. Todo lo anterior, permite vislumbrar algunas regulaciones epigenéticas específicas del grupo Tolerante, que reducen la señalización pro Th2 por parte de las células dendríticas, y aumentan la promoción de las respuestas Th1 y Treg.

El estudio de la metilación diferencial en células dendríticas ha demostrado que la inmunoterapia a dos concentraciones, que induce dos fenotipos diferentes a largo plazo, transforma los perfiles de metilación, en el contexto CpG, de las células dendríticas, afectando a la expresión de genes clave para la actividad tolerogénica o inflamatoria de estas células. Incluso, algunas de estas marcas epigenéticas pueden

convertirse en biomarcadores de gran utilidad, con mayor potencial que los basados en expresión (como se comentó vimos anteriormente) por la mayor estabilidad de estas marcas en particular y del ADN en general. Algunas de las DMPRs que pueden predecir el éxito de la inmunoterapia afectan a genes como: *Fcer1a*, *Il13*, *Cd209a*, *Il10ra*, *Tnf*, *Il12b* o *Il18r1*. No obstante, las células dendríticas tienen una supervivencia a largo plazo limitada, y la gran mayoría de los procesos efectores de la tolerancia inducida están controlados por las células T reguladoras. Por lo tanto, es esencial estudiar con detalle los efectos de la inmunoterapia sublingual con D1ManPrup3 sobre esta población de células.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

2. Mecanismos propios de las células T reguladoras regulados por la SLIT con D1ManPrup3

a. Estudio de metilación diferencial en regiones promotoras

A continuación, se condujo un último estudio de WGBS-seq para analizar las modificaciones epigenéticas provocadas por el tratamiento con el glicodendropéptido en las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺³⁵⁶. A continuación, se exponen los resultados obtenidos en este estudio.

En este caso, en las comparaciones contra el grupo Anafilaxia se obtuvieron 1.151 DMPRs para el grupo Alérgeno-solo, 1.576 para el grupo Tolerante y 1.580 para el grupo Desensibilizado (Tabla 6); ambos grupos tratados con la SLIT obtuvieron un número similar de DMPRs distribuidas de forma casi idéntica entre regiones hipermetiladas e hipometiladas, lo que podría indicar erróneamente que la inmunoterapia ha inducido los mismos mecanismos en ambos fenotipos protectores.

Tabla 6 – Tabla resumen de la metilación diferencial en regiones promotoras

Regiones promotoras diferencialmente metiladas	Antígeno-solo vs Anafilaxia	Tolerante vs Anafilaxia	Desensibilizado vs Anafilaxia
Todas	1.151	1.576	1.580
Hipermetiladas	469	951	953
Hipometiladas	682	625	627
Genes afectados	1.126	1.529	1.536

Sin embargo, a pesar de las similitudes cuantitativas, se detectaron diferencias notables a nivel de identidad de los genes afectados por ambos conjuntos de DMPRs (Figura 14), en sintonía con las discrepancias de las respuestas protectoras de ambos grupos, máxime cuando las células Treg tienen un papel protagonista en ese proceso inmunológico.

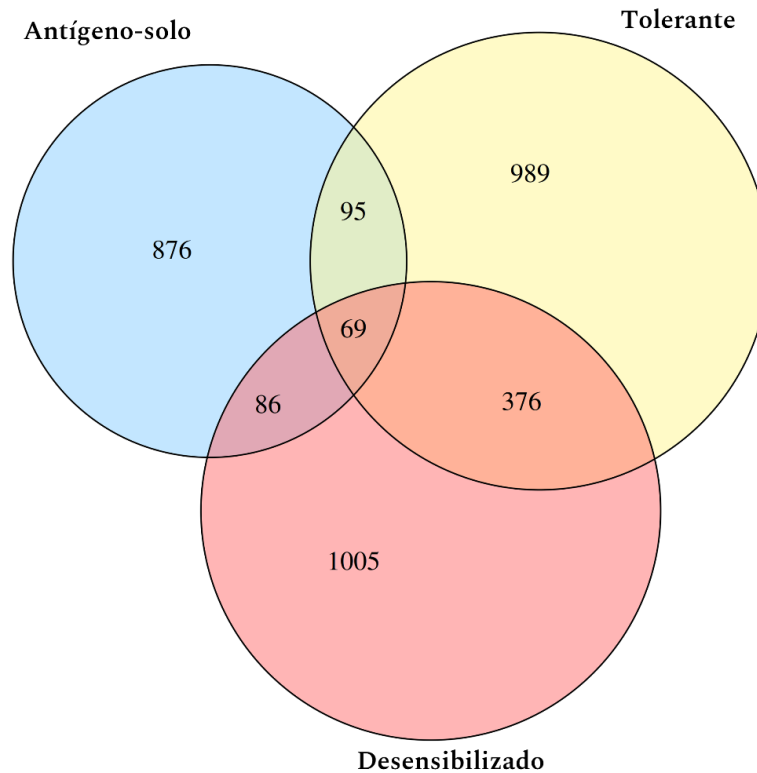


Figura 14. Diagramas de Venn para las listas de DMPRs detectas en el estudio.

En este sentido, los grupos Desensibilizado y Tolerante compartieron entre si 445 genes afectados por al menos una DMPR, y sólo 69 con el grupo Alérgeno-solo. De todas las DMPRs detectadas en este estudio, las más relevantes son aquellas que participan en la promoción y mantenimiento de la tolerancia. Especialmente destacan las que se hallaron en los promotores de diversos factores de transcripción (Tabla 7) que controlan el comportamiento y diferenciación de las células Treg; es por esto por lo que el análisis y discusión expuesto a continuación se centrará en estas regiones. Primero, en el promotor del gen *Stat4* se encontró una DMPR hipometilada para el grupo Tolerante y dos para el grupo Desensibilizado. Asumiendo una relación canónica, eso significaría un aumento de la expresión del factor de transcripción STAT4, lo cual suele producirse en

las células T presentes en un contexto inflamatorio³⁵⁷, además existen evidencias de que su expresión se regula por la metilación de su promotor³⁵⁸. STAT4 regula la expresión de citoquinas y otros genes involucrados en la respuesta inflamatoria, pudiendo desestabilizar la identidad reguladora de las células T reguladoras efectoras, que se caracterizan por poseer una ratio FoxP3 / STAT4 alta³⁵⁷.

Tabla 7 - Tabla resumen de la metilación diferencial en regiones promotoras de factores de transcripción

DPMRs	Antígeno-solo vs Anafilaxia	Tolerante vs Anafilaxia	Desensibilizado vs Anafilaxia
Todas	98	106	109
Hipermetiladas	33	75	70
Hipometiladas	65	31	39
TFs afectados	96	105	106
Top 50 (por p-valor ajustado)	2610008E11Rik, Six5, Zfp703, Egr3, Bbx, Carhsp1, Myrf, Bcl3, Plk3, Zfp277, Zfp872, Prox2, Cdk5, Ciz1, Tfe3, Zfp599, Snx6, Zscan22, Esx1, Pbx2, Tcf20, Fhl1, Tcf7, Tsc22d3, Mbtps2, Zfp874a, Hmgb3, Mbd2, Arx, Pdc4, Ash2l, Spz1, Hic2, Foxo3, Zfp982, Zfp998, Stat5b, Alyref, Rorc, Zbtb3, Mycbp2, Rfx5, Foxn3, Tfe3, Foxp3, St18, Snw1, Rbpjl, Gata6, Cd3d	Esr1, Stat4, Rprd1a, Zbtb24, Zfp998, Zfp768, Tonsl, Gm14295, Vsx1, Tcf4, Zbtb33, Mzf1, Arx, Elf4, Tsc22d1, Prdm6, Hdac2, Zfp361l, Med27, Zfp703, Rfx8, Zfp972, Relb, Snx6, Trip4, Kank1, Fbp1, Zfp111, Zfp982, Tead2, Zfp958, Tshz1, Zfp951, Pcbd1, Zfp568, Hdac7, Esrrb, Eya2, Bend3, Prdm12, Gtf2a1l, Zfp316, Bhlha15, Gata6, Helz2, Jdp2, Nr1h2, Zfp277, Zfp512, Cbx6	Zbtb24, Zfp2, Baz2a, Esr1, Stat4, Kdm2b, Mzf1, Tcf7l1, Zbtb41, Zfp748, Gata6, Snapc2, Arx, Ybx3, Tonsl, Foxg1, Calcoco1, Zfp382, Bcl6, Chd3, Prmt2, Rfx8, Zfp972, Gm14295, Zfp583, Pdlim1, Bcl9, Zfp59, Sirt1, Grip1, Irf6, Fbp1, Zfp473, Flna, Cdc73, Mdm4, Actn1, Tead2, Zfp316, Foxo3, Gm9049, Irf4, Eglh1, Nfatc1, Mzf1, Sp7, Ncoa3, Zmynd8, Mbd2, Nfe2

Es posible, que la inmunoterapia genere un contexto inflamatorio no alérgico, que favorezca el establecimiento de las DPMRs observadas en este estudio, y que además lo haga de forma dependiente de la dosis, ya que se detectaron dos DPMRs en el grupo Desensibilizado que recibió una dosis mayor de D1ManPrup3. No obstante, en el grupo Tolerante se detectó también una DMPR hipometilada en el promotor de FoxP3, que

potencialmente puede incluso aumentar la ratio FoxP3 / STAT4³⁵⁹, pudiendo mantener e incluso incrementar la estabilidad del programa de diferenciación de las células T reguladoras. Esto es coherente con estudios previos en el mismo modelo de inmunoterapia, que observaron un incremento de la actividad Treg FoxP3+ en los ratones tolerantes que se traducía en un aumento de la producción de IL-10, pero no los ratones desensibilizados^{257,267}. Este hallazgo tiene especial importancia, porque en la literatura se encuentran precedentes del control de la expresión de Foxp3 por la metilación de sus elementos reguladores³⁵⁹, y también, de su influencia en la tolerancia a alérgenos de origen alimentario³⁶⁰. Todo lo anterior convierte a la DMPR de *Foxp3* en un prometedor biomarcador de efectividad de la inmunoterapia, porque además ya se ha descrito previamente que la hipometilación de *Foxp3* aumenta el mantenimiento de la protección a cacahuete en un modelo murino de EPIT³⁶¹. Como se observó previamente, el grupo Desensibilizado no se caracteriza por presentar un incremento significativo de la actividad T reguladora, lo cual podría explicarse potencialmente por la reducción en esta ratio FoxP3/STAT4^{257,267}. Además, en este mismo sentido, en el grupo Desensibilizado se encontró una DMPR hipometilada afectando al gen Foxp1, lo que podría posiblemente podría producir una ratio FoxP3/FoxP1 baja, siendo esto característico de las células Tregs no efectoras³⁵⁷. Por tanto, las marcas de metilación inducidas aquí expuestas se relacionan con la capacidad de las células T reguladoras para desarrollar su rol efector bajo condiciones inflamatorias, y permiten separar los animales tolerantes de los desensibilizados transitoriamente.

Adicionalmente, en el grupo Desensibilizado se encontró una DMPR hipometilada en el promotor de *Gata3*, el factor de transcripción principal de las células T de tipo Th2³⁶², que es esencial para el desarrollo y la proliferación de las células Th2³⁶³. Esta hipometilación, puede estar relacionada con la pérdida de efectividad de la SLIT en el grupo Desensibilizado. Por lo tanto, es importante considerar que el equilibrio entre *Gata3* y *Foxp3* es esencial para mantener la estabilidad del fenotipo Treg en las células

T^{362,363}. Otro hallazgo relevante de este estudio han sido las DMPRs detectadas en los promotores de los factores de transcripción *Stat5a* y *Stat5b*, que solo se encontraron en el grupo Desensibilizado. STAT5 es esencial para el desarrollo y mantenimiento de las células T reguladoras³⁶⁴, previniendo la producción de la IL-17 y por lo tanto la diferenciación hacia el fenotipo Th17³⁶⁵, y también, participa en la producción de citoquinas y la degranulación mediadas por IgE³⁶⁶. Es necesario mencionar, que *Stat5b* es clave para la correcta expresión de *Foxp3*, por lo que una alteración en su expresión puede afectar a su vez a la expresión de *Foxp3*, y por lo tanto incrementa la susceptibilidad a las enfermedades alérgicas³⁶⁷. Este descubrimiento refuerza los hallazgos anteriormente mencionados, los cambios en la metilación del promotor de *Stat5b* pueden estar alterando la expresión de FoxP3, y afectando en último lugar a los mecanismos tolerogénicos de las células Treg de los animales desensibilizados, provocando la pérdida de la protección con el paso del tiempo.

Los resultados de este estudio incluyen múltiples cambios en la metilación de los promotores génicos de factores de transcripción que gobiernan la diferenciación y función de las células T reguladoras. Y además, prueba de nuevo que la inmunoterapia genera cambios en la metilación del ADN de un modo dependiente de la concentración, del mismo modo que genera los fenotipos tolerante y desensibilizados. Gracias a esto es posible proponer varios biomarcadores pronósticos estables para la inmunoterapia sublingual con glicodendropéptidos específicos de las células Treg, como por ejemplo, *Stat5b*, *Foxp3*, *Stat4*, *Gata3*, y *Foxp1*.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3. Discusión final.

Estos estudios ómicos han permitido evidenciar múltiples cambios inmunológicos inducidos por la inmunoterapia, tanto a nivel transcripcional como epigenético. Los cambios encontrados han permitido identificar distintos mecanismos implicados en la protección ante la exposición de Pru p 3 independiente de la dosis, como por ejemplo, la reducción de expresión de la *Il12b* provocada por la hipermetilación de regiones concretas de su promotor en las células dendríticas, que se encuentran en ratones tolerantes y desensibilizados, lo cual favorece el desarrollo de la respuesta Th1. También ha permitido vislumbrar los procesos moleculares y celulares que podrían estar detrás de la reversión hacia el fenotipo anafiláctico de los ratones desensibilizados, destacando la sobreexpresión del gen *Tnf* que se acompaña de dos regiones diferencialmente metiladas en las células dendríticas de los ratones desensibilizados, y también las DMPRs en el promotor de los factores de transcripción *Stat5b*, *Stat4* y *Foxp1* de las células Treg de los mismos ratones. Igualmente, han habilitado la exploración de las rutas de señalización que promocionan la respuesta Treg tolerogénica en el grupo de ratones tolerantes, por ejemplo, en las células dendríticas se detectó un cambio significativo en la expresión, y también en la metilación del promotor, del gen *Maf*, que controla mediante el eje mTOR la respuesta reguladora de las células dendríticas. Además, en las células Treg del grupo de animales tolerantes se halló una región diferencialmente hipometilada en el promotor de *Foxp3* que potencialmente promueve la estabilidad y función efectora de estas células reguladoras. Sin embargo, aunque los resultados obtenidos son potencialmente transferibles a humanos, se debe ser cauteloso con la extrapolación directa, por lo que los diferentes biomarcadores propuestos deberán estudiarse en una cohorte amplia de pacientes alérgicos. Además, los distintos mecanismos que se han observado implicados en las distintas respuestas a Pru p 3, deberán ser estudiados con mayor profundidad para poder dilucidar completamente las rutas de señalización que participan. Por ejemplo, nuevos estudios pueden tratar de

corroborar algunos de estos resultados a nivel de proteína con experimentos más dirigidos, o pueden estudiar los cambios observados a diferentes tiempos antes, durante y después del tratamiento, ya sea por nuevos experimentos de secuenciación masiva o biología molecular de carácter más clásico. También se pueden estudiar simultáneamente la composición celular y la expresión génica tras el tratamiento en los ganglios linfáticos, aplicando técnicas de secuenciación de células aisladas (*single cell sequencing*), incluyendo la caracterización de las células T, reguladoras o no, específicas para el péptido de la inmunoterapia, lo cual permitiría explorar la modificación del comportamiento de estas células por el tratamiento. En definitiva, estos estudios han contribuido a conocer la implicación de diversas rutas de señalización, como el eje mTOR, en la tolerancia inducida por D1ManPrup3, y han aportado numerosos candidatos a biomarcadores de éxito del tratamiento, como por ejemplo los genes *Maf*, *Il12b*, *Stat5b*, *Fcer1a*, *Il10ra*, y *Foxp3* entre otros; que tienen el potencial suficiente para diferenciar de forma segura los pacientes respondedores tolerantes de los respondedores desensibilizados, y a su vez de los no respondedores a la inmunoterapia sublingual.

CONCLUSIONES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

- La inmunoterapia sublingual con D1ManPrup3 induce cambios a **nivel de expresión génica** en las células dendríticas, los cuales se generan en función de la dosis aplicada, y por tanto, del fenotipo protector, que puede ser transitorio o a largo plazo.
 - **La respuesta de tolerancia** a largo plazo se caracteriza por la expresión diferencial de genes que promueven la acción tolerogénica de las células dendríticas mediante la activación de la ruta de señalización de mTOR en los ganglios linfáticos; induciendo a su vez la diferenciación, activación y proliferación de las células T reguladoras.
 - **La respuesta de desensibilización** se caracteriza por la expresión diferencial de genes relacionados con procesos proinflamatorios que promueven la pérdida de protección asociada al tratamiento.
- **A nivel epigenético**, la inmunoterapia con D1ManPrup3 modifica de manera dosis-dependiente el perfil de metilación del ADN de células claves para la respuesta inmunológica, las células dendríticas y las células T reguladoras.
 - La metilación diferencial detectada en las **células dendríticas** afecta a los promotores de múltiples genes expresados diferencialmente implicados en los mecanismos de tolerancia inducida, y con la pérdida de ésta en la desensibilización.
 - La inmunoterapia sublingual modifica la metilación de los promotores de factores de transcripción esenciales para la estabilidad de la **función reguladora en las células T**, como por ejemplo GATA-3 en los animales desensibilizados y FoxP3 en los animales tolerantes.
- Estos resultados permiten proponer diversos biomarcadores pronósticos de respuesta en la inmunoterapia sublingual, que pueden aplicarse a nivel de expresión, tanto en ARN como en proteína, como a nivel epigenético.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

REFERENCIAS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Akdis, C. A., Agache, I. & Immunology, E. A. of A. and C. *Global Atlas of Allergy*. (European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2014).
2. Bergmann, K. C. & Ring, J. *History of Allergy*. (S. Karger AG, 2014).
3. Jarvis, D. *et al.* Asthma in adults and its association with chronic rhinosinusitis: the GA2LEN survey in Europe. *Allergy* **67**, 91–8 (2012).
4. Brożek, J. L. *et al.* Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines-2016 revision. *J Allergy Clin Immunol* **140**, 950–958 (2017).
5. NIAID-Sponsored Expert Panel *et al.* Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *J Allergy Clin Immunol* **126**, S1–58 (2010).
6. Johansson, S. G. O. *et al.* A revised nomenclature for allergy: An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* **56**, 813–824 (2001).
7. Johansson, S. G. O. *et al.* Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **113**, 832–836 (2004).
8. Dispenza, M. C. Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Proc* **40**, 470–473 (2019).
9. Tang, M. L. K. & Mullins, R. J. Food allergy: is prevalence increasing? *Intern Med J* **47**, 256–261 (2017).
10. Savage, J. & Johns, C. B. Food allergy: epidemiology and natural history. *Immunol Allergy Clin North Am* **35**, 45–59 (2015).
11. Sicherer, S. H. & Sampson, H. A. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *J Allergy Clin Immunol* **141**, 41–58 (2018).
12. Dunlop, J. H. & Keet, C. A. Epidemiology of Food Allergy. *Immunol Allergy Clin North Am* **38**, 13–25 (2018).
13. Warren, C. M., Jiang, J. & Gupta, R. S. Epidemiology and Burden of Food Allergy. *Curr Allergy Asthma Rep* **20**, 6 (2020).
14. Anvari, S., Chokshi, N. Y., Kamili, Q. U. A. & Davis, C. M. Evolution of Guidelines on Peanut Allergy and Peanut Introduction in Infants: A Review. *JAMA Pediatr* **171**, 77–82 (2017).
15. Gupta, R. S. *et al.* The Public Health Impact of Parent-Reported Childhood Food Allergies in the United States. *Pediatrics* **142**, (2018).

16. Lyons, S. A. *et al.* Food Allergy in Adults: Substantial Variation in Prevalence and Causative Foods Across Europe. *J Allergy Clin Immunol Pract* **7**, 1920-1928.e11 (2019).
17. Nwaru, B. I. *et al.* Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* **69**, 992-1007 (2014).
18. Santos, A. F. *et al.* Distinct parameters of the basophil activation test reflect the severity and threshold of allergic reactions to peanut. *J Allergy Clin Immunol* **135**, 179-86 (2015).
19. Song, Y. *et al.* Correlations between basophil activation, allergen-specific IgE with outcome and severity of oral food challenges. *Ann Allergy Asthma Immunol* **114**, 319-26 (2015).
20. Santos, A. F. *et al.* Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children. *J Allergy Clin Immunol* **134**, 645-52 (2014).
21. Pouessel, G. *et al.* Food-induced fatal anaphylaxis: From epidemiological data to general prevention strategies. *Clin Exp Allergy* **48**, 1584-1593 (2018).
22. Turner, P. J. *et al.* Fatal Anaphylaxis: Mortality Rate and Risk Factors. *J Allergy Clin Immunol Pract* **5**, 1169-1178 (2017).
23. Muraro, A. & Mendoza Hernandez, D. A. Managing food allergy and anaphylaxis: A new model for an integrated approach. *Allergol Int* **69**, 19-27 (2020).
24. Ojeda, P. *et al.* Alergológica 2015: A National Survey on Allergic Diseases in the Spanish Pediatric Population. *J Investig Allergol Clin Immunol* **28**, 321-329 (2018).
25. Pascal, M. *et al.* Lipid transfer protein syndrome: clinical pattern, cofactor effect and profile of molecular sensitization to plant-foods and pollens. *Clin Exp Allergy* **42**, 1529-39 (2012).
26. Cianferoni, A. & Muraro, A. Food-induced anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin North Am* **32**, 165-95 (2012).
27. Liccardi, G., Caminati, M., Senna, G., Calzetta, L. & Rogliani, P. Anaphylaxis and intimate behaviour. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **17**, 350-355 (2017).
28. Islam, N. & Chu, D. K. What is causing the rise in food allergy? A narrative review of risk factors for the development of food allergy in infants and children. *Frontiers in allergy* **3**, 1037596 (2022).
29. Winters, A. *et al.* The MALT1 locus and peanut avoidance in the risk for peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* **143**, 2326-2329 (2019).



30. Asai, Y. *et al.* Genome-wide association study and meta-analysis in multiple populations identifies new loci for peanut allergy and establishes C11orf30/EMSY as a genetic risk factor for food allergy. *J Allergy Clin Immunol* **141**, 991–1001 (2018).
31. Groschwitz, K. R. & Hogan, S. P. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* **124**, 3–20; quiz 21–2 (2009).
32. Noah, T. K. *et al.* IL-13-induced intestinal secretory epithelial cell antigen passages are required for IgE-mediated food-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* **144**, 1058–1073.e3 (2019).
33. McDole, J. R. *et al.* Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature* **483**, 345–9 (2012).
34. Kulkarni, D. H. *et al.* Goblet cell associated antigen passages support the induction and maintenance of oral tolerance. *Mucosal Immunol* **13**, 271–282 (2020).
35. Xiong, Y., Xu, G., Chen, M. & Ma, H. Intestinal Uptake and Tolerance to Food Antigens. *Front Immunol* **13**, 906122 (2022).
36. Turner, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**, 799–809 (2009).
37. Grozdanovic, M. M. *et al.* Kiwifruit cysteine protease actinidin compromises the intestinal barrier by disrupting tight junctions. *Biochim Biophys Acta* **1860**, 516–26 (2016).
38. Fries, W., Belvedere, A. & Vetrano, S. Sealing the broken barrier in IBD: intestinal permeability, epithelial cells and junctions. *Curr Drug Targets* **14**, 1460–70 (2013).
39. Allaire, J. M. *et al.* The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol* **39**, 677–696 (2018).
40. Knoop, K. A. *et al.* Antibiotics promote the sampling of luminal antigens and bacteria via colonic goblet cell associated antigen passages. *Gut Microbes* **8**, 400–411 (2017).
41. Jang, M. H. *et al.* Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6110–5 (2004).
42. Suzuki, H. *et al.* Ovalbumin-protein sigma 1 M-cell targeting facilitates oral tolerance with reduction of antigen-specific CD4+ T cells. *Gastroenterology* **135**, 917–25 (2008).
43. Sakhon, O. S. *et al.* M cell-derived vesicles suggest a unique pathway for trans-epithelial antigen delivery. *Tissue Barriers* **3**, e1004975 (2015).
44. Liu, E. G., Yin, X., Swaminathan, A. & Eisenbarth, S. C. Antigen-Presenting Cells in Food Tolerance and Allergy. *Front Immunol* **11**, 616020 (2020).

45. Parrish, A., Boudaud, M., Kuehn, A., Ollert, M. & Desai, M. S. Intestinal mucus barrier: a missing piece of the puzzle in food allergy. *Trends Mol Med* **28**, 36–50 (2022).
46. Shan, M. *et al.* Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science* **342**, 447–53 (2013).
47. Hadis, U. *et al.* Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* **34**, 237–46 (2011).
48. Kim, K. S. *et al.* Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. *Science* **351**, 858–63 (2016).
49. Cahenzli, J., Köller, Y., Wyss, M., Geuking, M. B. & McCoy, K. D. Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. *Cell Host Microbe* **14**, 559–70 (2013).
50. Sarkar, A., Yoo, J. Y., Valeria Ozorio Dutra, S., Morgan, K. H. & Groer, M. The Association between Early-Life Gut Microbiota and Long-Term Health and Diseases. *J Clin Med* **10**, (2021).
51. Geuking, M. B. *et al.* Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity* **34**, 794–806 (2011).
52. Atarashi, K. *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* **331**, 337–41 (2011).
53. Russler-Germain, E. V, Rengarajan, S. & Hsieh, C.-S. Antigen-specific regulatory T-cell responses to intestinal microbiota. *Mucosal Immunol* **10**, 1375–1386 (2017).
54. Mager, L. F. *et al.* Microbiome-derived inosine modulates response to checkpoint inhibitor immunotherapy. *Science* **369**, 1481–1489 (2020).
55. Yang, W. *et al.* Intestinal microbiota-derived short-chain fatty acids regulation of immune cell IL-22 production and gut immunity. *Nat Commun* **11**, 4457 (2020).
56. Akdis, C. A. The epithelial barrier hypothesis proposes a comprehensive understanding of the origins of allergic and other chronic noncommunicable diseases. *J Allergy Clin Immunol* **149**, 41–44 (2022).
57. Vercelli, D. Microbiota and human allergic diseases: the company we keep. *Curr Opin Immunol* **72**, 215–220 (2021).
58. Soumelis, V. *et al.* Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* **3**, 673–80 (2002).
59. Fort, M. M. *et al.* IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* **15**, 985–95 (2001).



60. Morita, H., Moro, K. & Koyasu, S. Innate lymphoid cells in allergic and nonallergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* **138**, 1253–1264 (2016).
61. Khodoun, M. V, Tomar, S., Tocker, J. E., Wang, Y. H. & Finkelman, F. D. Prevention of food allergy development and suppression of established food allergy by neutralization of thymic stromal lymphopoietin, IL-25, and IL-33. *J Allergy Clin Immunol* **141**, 171-179.e1 (2018).
62. Bourque, J. & Hawiger, D. Activation, Amplification, and Ablation as Dynamic Mechanisms of Dendritic Cell Maturation. *Biology (Basel)* **12**, (2023).
63. Jensen, S. S. & Gad, M. Differential induction of inflammatory cytokines by dendritic cells treated with novel TLR-agonist and cytokine based cocktails: targeting dendritic cells in autoimmunity. *J Inflamm (Lond)* **7**, 37 (2010).
64. Krishnaswamy, J. K., Alsén, S., Yrlid, U., Eisenbarth, S. C. & Williams, A. Determination of T Follicular Helper Cell Fate by Dendritic Cells. *Front Immunol* **9**, 2169 (2018).
65. Hong, W., Yang, B., He, Q., Wang, J. & Weng, Q. New Insights of CCR7 Signaling in Dendritic Cell Migration and Inflammatory Diseases. *Front Pharmacol* **13**, 841687 (2022).
66. Chen, C.-Y. *et al.* Induction of Interleukin-9-Producing Mucosal Mast Cells Promotes Susceptibility to IgE-Mediated Experimental Food Allergy. *Immunity* **43**, 788–802 (2015).
67. Noval Rivas, M., Burton, O. T., Oettgen, H. C. & Chatila, T. IL-4 production by group 2 innate lymphoid cells promotes food allergy by blocking regulatory T-cell function. *J Allergy Clin Immunol* **138**, 801-811.e9 (2016).
68. Hammad, H. & Lambrecht, B. N. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity* **43**, 29–40 (2015).
69. Lee, J.-B. *et al.* IL-25 and CD4(+) TH2 cells enhance type 2 innate lymphoid cell-derived IL-13 production, which promotes IgE-mediated experimental food allergy. *J Allergy Clin Immunol* **137**, 1216-1225.e5 (2016).
70. Kumar, S., Jeong, Y., Ashraf, M. U. & Bae, Y.-S. Dendritic Cell-Mediated Th2 Immunity and Immune Disorders. *Int J Mol Sci* **20**, (2019).
71. León, B. Understanding the development of Th2 cell-driven allergic airway disease in early life. *Frontiers in allergy* **3**, 1080153 (2022).
72. Koenig, J. F. E. *et al.* Memory Generation and Re-Activation in Food Allergy. *Immunotargets Ther* **10**, 171–184 (2021).

73. Yu, K. & Lieber, M. R. Current insights into the mechanism of mammalian immunoglobulin class switch recombination. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **54**, 333–351 (2019).
74. Gowthaman, U., Chen, J. S. & Eisenbarth, S. C. Regulation of IgE by T follicular helper cells. *J Leukoc Biol* **107**, 409–418 (2020).
75. Allen, C. D. C. Features of B Cell Responses Relevant to Allergic Disease. *J Immunol* **208**, 257–266 (2022).
76. Gowthaman, U. *et al.* Identification of a T follicular helper cell subset that drives anaphylactic IgE. *Science* **365**, (2019).
77. Burks, A. W. *et al.* *Middleton's Allergy E-Book: Principles and Practice*. (Elsevier Health Sciences, 2019).
78. Shamji, M. H. *et al.* The role of allergen-specific IgE, IgG and IgA in allergic disease. *Allergy* **76**, 3627–3641 (2021).
79. Ando, T. & Kitauro, J. Tuning IgE: IgE-Associating Molecules and Their Effects on IgE-Dependent Mast Cell Reactions. *Cells* **10**, (2021).
80. Maurer, D. *et al.* The high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) mediates IgE-dependent allergen presentation. *J Immunol* **154**, 6285–90 (1995).
81. Vitte, J., Vibhushan, S., Bratti, M., Montero-Hernandez, J. E. & Blank, U. Allergy, Anaphylaxis, and Nonallergic Hypersensitivity: IgE, Mast Cells, and Beyond. *Med Princ Pract* **31**, 501–515 (2022).
82. Charitos, I. A., Castellaneta, F., Santacroce, L. & Bottalico, L. Historical Anecdotes and Breakthroughs of Histamine: From Discovery to Date. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **21**, 801–814 (2021).
83. Boyce, J. A. Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunol Rev* **217**, 168–85 (2007).
84. Nakae, S. *et al.* TNF can contribute to multiple features of ovalbumin-induced allergic inflammation of the airways in mice. *J Allergy Clin Immunol* **119**, 680–6 (2007).
85. Akdis, M. *et al.* Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* **127**, 701-21.e1-70 (2011).
86. Galli, S. J. & Tsai, M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* **18**, 693–704 (2012).
87. Santamaria, L. F. *et al.* Antigen focusing by specific monomeric immunoglobulin E bound to CD23 on Epstein-Barr virus-transformed B cells. *Hum Immunol* **37**, 23–30 (1993).



88. Anvari, S., Miller, J., Yeh, C.-Y. & Davis, C. M. IgE-Mediated Food Allergy. *Clin Rev Allergy Immunol* **57**, 244–260 (2019).
89. Cox, L. S., Sanchez-Borges, M. & Lockey, R. F. World Allergy Organization Systemic Allergic Reaction Grading System: Is a Modification Needed? *J Allergy Clin Immunol Pract* **5**, 58–62.e5 (2017).
90. Alvarez-Perea, A. *et al.* Anaphylaxis in Adolescent/Adult Patients Treated in the Emergency Department: Differences Between Initial Impressions and the Definitive Diagnosis. *J Investig Allergol Clin Immunol* **25**, 288–94 (2015).
91. Ho, M. H.-K., Wong, W. H.-S. & Chang, C. Clinical spectrum of food allergies: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* **46**, 225–40 (2014).
92. Perry, T. T. & Pesek, R. D. Clinical manifestations of food allergy. *Pediatr Ann* **42**, 96–101 (2013).
93. Gomez, F. *et al.* High prevalence of lipid transfer protein sensitization in apple allergic patients with systemic symptoms. *PLoS One* **9**, e107304 (2014).
94. Amlot, P. L., Kemeny, D. M., Zachary, C., Parkes, P. & Lessof, M. H. Oral allergy syndrome (OAS): symptoms of IgE-mediated hypersensitivity to foods. *Clin Allergy* **17**, 33–42 (1987).
95. Wang, L.-J. *et al.* Clinical Manifestations of Pediatric Food Allergy: a Contemporary Review. *Clin Rev Allergy Immunol* **62**, 180–199 (2022).
96. Sharma, H. P., Bansil, S. & Uygungil, B. Signs and Symptoms of Food Allergy and Food-Induced Anaphylaxis. *Pediatr Clin North Am* **62**, 1377–92 (2015).
97. Maruyama, N. Components of plant-derived food allergens: Structure, diagnostics, and immunotherapy. *Allergol Int* **70**, 291–302 (2021).
98. Costa, J. *et al.* Are Physicochemical Properties Shaping the Allergenic Potency of Plant Allergens? *Clin Rev Allergy Immunol* **62**, 37–63 (2022).
99. Thomas, W. R., Hales, B. J. & Smith, W.-A. Structural biology of allergens. *Curr Allergy Asthma Rep* **5**, 388–93 (2005).
100. Lei, D. K. & Grammer, L. C. An overview of allergens. *Allergy Asthma Proc* **40**, 362–365 (2019).
101. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology*. (Elsevier Health Sciences, 2017).
102. Shakib, F., Ghaemmaghami, A. M. & Sewell, H. F. The molecular basis of allergenicity. *Trends Immunol* **29**, 633–42 (2008).

103. Kamalakannan, M., Chang, L. M., Grishina, G., Sampson, H. A. & Masilamani, M. Identification and characterization of DC-SIGN-binding glycoproteins in allergenic foods. *Allergy* **71**, 1145–55 (2016).
104. McKenna, O. E. *et al.* How relevant is panallergen sensitization in the development of allergies? *Pediatr Allergy Immunol* **27**, 560–8 (2016).
105. Fernández-Rivas, M., Benito, C., González-Mancebo, E. & de Durana, D. A. D. Allergies to fruits and vegetables. *Pediatr Allergy Immunol* **19**, 675–81 (2008).
106. Mari, A. Multiple pollen sensitization: a molecular approach to the diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol* **125**, 57–65 (2001).
107. Skypala, I. J. *et al.* Non-specific lipid-transfer proteins: Allergen structure and function, cross-reactivity, sensitization, and epidemiology. *Clin Transl Allergy* **11**, e12010 (2021).
108. Zuidmeer, L. & van Ree, R. Lipid transfer protein allergy: primary food allergy or pollen/food syndrome in some cases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **7**, 269–73 (2007).
109. García, B. E. *et al.* Respiratory allergy to peach leaves and lipid-transfer proteins. *Clinical & Experimental Allergy* **34**, 291–295 (2004).
110. Palacin, A. *et al.* Wheat lipid transfer protein is a major allergen associated with baker's asthma. *J Allergy Clin Immunol* **120**, 1132–8 (2007).
111. Barber, D. *et al.* Component-resolved diagnosis of pollen allergy based on skin testing with profilin, polcalcin and lipid transfer protein pan-allergens. *Clin Exp Allergy* **39**, 1764–73 (2009).
112. Pastorello, E. A. *et al.* Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100 degrees C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol* **112**, 775–83 (2003).
113. Fernández-Rivas, M. *et al.* Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. *J Allergy Clin Immunol* **112**, 789–95 (2003).
114. Shan, M. *et al.* Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science* **342**, 447–53 (2013).
115. Iliev, I. D. *et al.* Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut* **58**, 1481–9 (2009).

116. Cahenzli, J., Köller, Y., Wyss, M., Geuking, M. B. & McCoy, K. D. Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. *Cell Host Microbe* **14**, 559–70 (2013).
117. Sarkar, A., Yoo, J. Y., Valeria Ozorio Dutra, S., Morgan, K. H. & Groer, M. The Association between Early-Life Gut Microbiota and Long-Term Health and Diseases. *J Clin Med* **10**, (2021).
118. Xiong, Y., Xu, G., Chen, M. & Ma, H. Intestinal Uptake and Tolerance to Food Antigens. *Front Immunol* **13**, 906122 (2022).
119. Russell, S. L. *et al.* Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Rep* **13**, 440–7 (2012).
120. Geuking, M. B. *et al.* Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity* **34**, 794–806 (2011).
121. Gargano, D. *et al.* Food Allergy and Intolerance: A Narrative Review on Nutritional Concerns. *Nutrients* **13**, (2021).
122. Simonyte Sjödin, K., Vidman, L., Rydén, P. & West, C. E. Emerging evidence of the role of gut microbiota in the development of allergic diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **16**, 390–5 (2016).
123. Mager, L. F. *et al.* Microbiome-derived inosine modulates response to checkpoint inhibitor immunotherapy. *Science* **369**, 1481–1489 (2020).
124. Furusawa, Y. *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **504**, 446–50 (2013).
125. Tan, J. *et al.* Dietary Fiber and Bacterial SCFA Enhance Oral Tolerance and Protect against Food Allergy through Diverse Cellular Pathways. *Cell Rep* **15**, 2809–24 (2016).
126. Bessede, A. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature* **511**, 184–90 (2014).
127. Mortha, A. *et al.* Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science* **343**, 1249288 (2014).
128. Zhou, L. *et al.* Innate lymphoid cells support regulatory T cells in the intestine through interleukin-2. *Nature* **568**, 405–409 (2019).
129. Sahiner, U. M. *et al.* Innate lymphoid cells: The missing part of a puzzle in food allergy. *Allergy* **76**, 2002–2016 (2021).
130. Bertolini, T. B. *et al.* Role of orally induced regulatory T cells in immunotherapy and tolerance. *Cell Immunol* **359**, 104251 (2021).

131. Kang, S. G., Lim, H. W., Andrisani, O. M., Broxmeyer, H. E. & Kim, C. H. Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* **179**, 3724–33 (2007).
132. Medeiros, S. R. *et al.* Vitamin A supplementation leads to increases in regulatory CD4⁺Foxp3⁺LAP⁺ T cells in mice. *Nutrition* **31**, 1260–5 (2015).
133. Korn, T. *et al.* IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18460–5 (2008).
134. Matteoli, G. *et al.* Gut CD103⁺ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut* **59**, 595–604 (2010).
135. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* **30**, 531–64 (2012).
136. Whibley, N., Tucci, A. & Powrie, F. Regulatory T cell adaptation in the intestine and skin. *Nat Immunol* **20**, 386–396 (2019).
137. Verma, R. *et al.* Cell surface polysaccharides of *Bifidobacterium bifidum* induce the generation of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Sci Immunol* **3**, (2018).
138. Edwards, J. P. *et al.* The GARP/Latent TGF- β 1 complex on Treg cells modulates the induction of peripherally derived Treg cells during oral tolerance. *Eur J Immunol* **46**, 1480–9 (2016).
139. Stagg, A. J. Intestinal Dendritic Cells in Health and Gut Inflammation. *Front Immunol* **9**, 2883 (2018).
140. Kim, K. S. *et al.* Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. *Science* **351**, 858–63 (2016).
141. Saraiva, M., Vieira, P. & O’Garra, A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med* **217**, (2020).
142. Saraiva, M., Vieira, P. & O’Garra, A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med* **217**, (2020).
143. Shouval, D. S. *et al.* Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function. *Immunity* **40**, 706–19 (2014).
144. Murai, M. *et al.* Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol* **10**, 1178–84 (2009).



145. Boonpiyathad, T., Satitsuksanoa, P., Akdis, M. & Akdis, C. A. IL-10 producing T and B cells in allergy. *Semin Immunol* **44**, 101326 (2019).
146. Coomes, S. M. *et al.* CD4⁺ Th2 cells are directly regulated by IL-10 during allergic airway inflammation. *Mucosal Immunol* **10**, 150–161 (2017).
147. van Scott, M. R. *et al.* IL-10 reduces Th2 cytokine production and eosinophilia but augments airway reactivity in allergic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **278**, L667-74 (2000).
148. Nagata, K. & Nishiyama, C. IL-10 in Mast Cell-Mediated Immune Responses: Anti-Inflammatory and Proinflammatory Roles. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
149. Rigas, D. *et al.* Type 2 innate lymphoid cell suppression by regulatory T cells attenuates airway hyperreactivity and requires inducible T-cell costimulator-inducible T-cell costimulator ligand interaction. *J Allergy Clin Immunol* **139**, 1468-1477.e2 (2017).
150. Haque, T. T. & Frischmeyer-Guerrero, P. A. The Role of TGF β and Other Cytokines in Regulating Mast Cell Functions in Allergic Inflammation. *Int J Mol Sci* **23**, (2022).
151. Fujio, K. *et al.* Revisiting the regulatory roles of the TGF- β family of cytokines. *Autoimmun Rev* **15**, 917–22 (2016).
152. Belghith, M. *et al.* TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nat Med* **9**, 1202–8 (2003).
153. Collison, L. W. *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **450**, 566–9 (2007).
154. Sullivan, J. A. *et al.* Treg-Cell-Derived IL-35-Coated Extracellular Vesicles Promote Infectious Tolerance. *Cell Rep* **30**, 1039-1051.e5 (2020).
155. Okoye, I. S. *et al.* MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells. *Immunity* **41**, 89–103 (2014).
156. Timperi, E. & Barnaba, V. CD39 Regulation and Functions in T Cells. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
157. Lin, A. A., Freeman, A. F. & Nutman, T. B. IL-10 Indirectly Downregulates IL-4-Induced IgE Production by Human B Cells. *Immunohorizons* **2**, 398–406 (2018).
158. Meiler, F., Klunker, S., Zimmermann, M., Akdis, C. A. & Akdis, M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* **63**, 1455–63 (2008).



159. Rogosch, T. *et al.* IgG4 and IgE transcripts in childhood allergic asthma reflect divergent antigen-driven selection. *J Immunol* **193**, 5801–8 (2014).
160. Lourenço, E. V & La Cava, A. Natural regulatory T cells in autoimmunity. *Autoimmunity* **44**, 33–42 (2011).
161. Savage, P. A., Klawon, D. E. J. & Miller, C. H. Regulatory T Cell Development. *Annu Rev Immunol* **38**, 421–453 (2020).
162. Owen, D. L., Sjaastad, L. E. & Farrar, M. A. Regulatory T Cell Development in the Thymus. *J Immunol* **203**, 2031–2041 (2019).
163. Stockinger, B., Barthlott, T. & Kassiotis, G. T cell regulation: a special job or everyone's responsibility? *Nat Immunol* **2**, 757–8 (2001).
164. Round, J. L. & Mazmanian, S. K. Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12204–9 (2010).
165. Hadis, U. *et al.* Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3⁺ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* **34**, 237–46 (2011).
166. Wawrzyniak, M., O'Mahony, L. & Akdis, M. Role of Regulatory Cells in Oral Tolerance. *Allergy Asthma Immunol Res* **9**, 107 (2017).
167. Kim, A.-R. *et al.* Mesenteric IL-10-producing CD5⁺ regulatory B cells suppress cow's milk casein-induced allergic responses in mice. *Sci Rep* **6**, 19685 (2016).
168. Mielle, J. *et al.* IL-10 Producing B Cells Ability to Induce Regulatory T Cells Is Maintained in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* **9**, 961 (2018).
169. Natarajan, P. *et al.* Regulatory B cells from hilar lymph nodes of tolerant mice in a murine model of allergic airway disease are CD5⁺, express TGF- β , and co-localize with CD4⁺Foxp3⁺ T cells. *Mucosal Immunol* **5**, 691–701 (2012).
170. Boyce, J. A. *et al.* Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: summary of the NIAID-sponsored expert panel report. *J Am Diet Assoc* **111**, 17–27 (2011).
171. Mayorga, C. *et al.* New Insights in Therapy for Food Allergy. *Foods* **10**, (2021).
172. Yu, J. W. *et al.* Accidental ingestions in children with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* **118**, 466–72 (2006).
173. Perkin, M. R. *et al.* Enquiring About Tolerance (EAT) study: Feasibility of an early allergenic food introduction regimen. *J Allergy Clin Immunol* **137**, 1477–1486.e8 (2016).



174. Koplin, J. J. *et al.* Can early introduction of egg prevent egg allergy in infants? A population-based study. *J Allergy Clin Immunol* **126**, 807–13 (2010).
175. Katz, Y. *et al.* Early exposure to cow's milk protein is protective against IgE-mediated cow's milk protein allergy. *J Allergy Clin Immunol* **126**, 77-82.e1 (2010).
176. Du Toit, G. *et al.* Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* **122**, 984–91 (2008).
177. Food Allergy in under 19s: Assessment and Diagnosis. Available online: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg116> (accessed on 25 March 2023).
178. Pascal, M. *et al.* Asymptomatic LTP sensitisation is common in plant-food allergic children from the Northeast of Spain. *Allergol Immunopathol (Madr)* **44**, 351–8 (2016).
179. Rial, M. J., Barroso, B. & Sastre, J. Dupilumab for treatment of food allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract* **7**, 673–674 (2019).
180. Chinthrajah, S. *et al.* Phase 2a randomized, placebo-controlled study of anti-IL-33 in peanut allergy. *JCI Insight* **4**, (2019).
181. Fiocchi, A. *et al.* Impact of Omalizumab on Food Allergy in Patients Treated for Asthma: A Real-Life Study. *J Allergy Clin Immunol Pract* **7**, 1901-1909.e5 (2019).
182. MacGinnitie, A. J. *et al.* Omalizumab facilitates rapid oral desensitization for peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* **139**, 873-881.e8 (2017).
183. Andorf, S. *et al.* A Phase 2 Randomized Controlled Multisite Study Using Omalizumab-facilitated Rapid Desensitization to Test Continued vs Discontinued Dosing in Multifood Allergic Individuals. *EClinicalMedicine* **7**, 27–38 (2019).
184. Frischmeyer-Guerrero, P. A. *et al.* Mechanistic correlates of clinical responses to omalizumab in the setting of oral immunotherapy for milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* **140**, 1043-1053.e8 (2017).
185. Berni Canani, R. *et al.* Extensively hydrolyzed casein formula containing *Lactobacillus rhamnosus* GG reduces the occurrence of other allergic manifestations in children with cow's milk allergy: 3-year randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* **139**, 1906-1913.e4 (2017).
186. Hsiao, K.-C. *et al.* Long-term clinical and immunological effects of probiotic and peanut oral immunotherapy after treatment cessation: 4-year follow-up of a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Child Adolesc Health* **1**, 97–105 (2017).

187. NOON, L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **4**, 285–8 (1953).
188. Maggi, E. T-cell responses induced by allergen-specific immunotherapy. *Clin Exp Immunol* **161**, 10–8 (2010).
189. Seiberling, K., Hiebert, J., Nyirady, J., Lin, S. & Chang, D. Cost of allergy immunotherapy: sublingual vs subcutaneous administration. *Int Forum Allergy Rhinol* **2**, 460–4 (2012).
190. Dorofeeva, Y. *et al.* Past, present, and future of allergen immunotherapy vaccines. *Allergy* **76**, 131–149 (2021).
191. Zuidmeer-Jongejan, L. *et al.* Development of a hypoallergenic recombinant parvalbumin for first-in-man subcutaneous immunotherapy of fish allergy. *Int Arch Allergy Immunol* **166**, 41–51 (2015).
192. Mondoulet, L., Dioszeghy, V., Thébault, C., Benhamou, P.-H. & Dupont, C. Epicutaneous immunotherapy for food allergy as a novel pathway for oral tolerance induction. *Immunotherapy* **7**, 1293–305 (2015).
193. Senti, G. *et al.* Epicutaneous allergen administration as a novel method of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* **124**, 997–1002 (2009).
194. Dioszeghy, V. *et al.* Differences in phenotype, homing properties and suppressive activities of regulatory T cells induced by epicutaneous, oral or sublingual immunotherapy in mice sensitized to peanut. *Cell Mol Immunol* **14**, 770–782 (2017).
195. Dioszeghy, V. *et al.* Epicutaneous immunotherapy results in rapid allergen uptake by dendritic cells through intact skin and downregulates the allergen-specific response in sensitized mice. *J Immunol* **186**, 5629–37 (2011).
196. Tordesillas, L. *et al.* Epicutaneous immunotherapy induces gastrointestinal LAP+ regulatory T cells and prevents food-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* **139**, 189–201.e4 (2017).
197. Jones, S. M. *et al.* Epicutaneous immunotherapy for the treatment of peanut allergy in children and young adults. *J Allergy Clin Immunol* **139**, 1242–1252.e9 (2017).
198. Tice, J. A. *et al.* The Effectiveness and Value of Oral Immunotherapy and Viaskin Peanut for Peanut Allergy. *J Manag Care Spec Pharm* **26**, 620–623 (2020).
199. Anagnostou, K. & Clark, A. Oral Immunotherapy for Peanut Allergy. *Annu Rev Med* **67**, 375–85 (2016).
200. Moran, T. P., Vickery, B. P. & Burks, A. W. Oral and sublingual immunotherapy for food allergy: current progress and future directions. *Curr Opin Immunol* **25**, 781–7 (2013).



201. Dunlop, J. H. Oral immunotherapy for treatment of peanut allergy. *J Investig Med* **68**, 1152–1155 (2020).
202. Lucendo, A. J., Arias, A. & Tenias, J. M. Relation between eosinophilic esophagitis and oral immunotherapy for food allergy: a systematic review with meta-analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol* **113**, 624–9 (2014).
203. Pelaez-Prestel, H. F., Sanchez-Trincado, J. L., Lafuente, E. M. & Reche, P. A. Immune Tolerance in the Oral Mucosa. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
204. Cox, L. Sublingual immunotherapy and allergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep* **8**, 102–10 (2008).
205. Narisety, S. D. *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of sublingual versus oral immunotherapy for the treatment of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* **135**, 1275–82.e1–6 (2015).
206. Chin, S. J. *et al.* Sublingual versus oral immunotherapy for peanut-allergic children: a retrospective comparison. *J Allergy Clin Immunol* **132**, 476–8.e2 (2013).
207. Le, U. H. & Burks, A. W. Oral and sublingual immunotherapy for food allergy. *World Allergy Organ J* **7**, 35 (2014).
208. Mempel, M., Rakoski, J., Ring, J. & Ollert, M. Severe anaphylaxis to kiwi fruit: Immunologic changes related to successful sublingual allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* **111**, 1406–9 (2003).
209. Fleischer, D. M. *et al.* Sublingual immunotherapy for peanut allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial. *J Allergy Clin Immunol* **131**, 119–27.e1–7 (2013).
210. Gomez, F. *et al.* The clinical and immunological effects of Pru p 3 sublingual immunotherapy on peach and peanut allergy in patients with systemic reactions. *Clin Exp Allergy* **47**, 339–350 (2017).
211. Palomares, F. *et al.* Immunological Changes Induced in Peach Allergy Patients with Systemic Reactions by Pru p 3 Sublingual Immunotherapy. *Mol Nutr Food Res* **62**, (2018).
212. Valenta, R., Campana, R., Focke-Tejkl, M. & Niederberger, V. Vaccine development for allergen-specific immunotherapy based on recombinant allergens and synthetic allergen peptides: Lessons from the past and novel mechanisms of action for the future. *J Allergy Clin Immunol* **137**, 351–7 (2016).
213. Wood, R. A. *et al.* A phase 1 study of heat/phenol-killed, E. coli-encapsulated, recombinant modified peanut proteins Ara h 1, Ara h 2, and Ara h 3 (EMP-123) for the treatment of peanut allergy. *Allergy* **68**, 803–8 (2013).

214. Kitzmüller, C., Jahn-Schmid, B., Kinaciyan, T. & Bohle, B. Sublingual immunotherapy with recombinant Mal d 1 downregulates the allergen-specific Th2 response. *Allergy* **74**, 1579–1581 (2019).
215. Toda, M. *et al.* Protein unfolding strongly modulates the allergenicity and immunogenicity of Pru p 3, the major peach allergen. *J Allergy Clin Immunol* **128**, 1022–30.e1–7 (2011).
216. Rodriguez, M. J. *et al.* Immunotherapy with Native Molecule rather than Hypoallergenic Variant of Pru p 3, the Major Peach Allergen, Shows Beneficial Effects in Mice. *J Immunol Res* **2018**, 3479185 (2018).
217. Gupta, K., Kumar, S., Das, M. & Dwivedi, P. D. Peptide based immunotherapy: a pivotal tool for allergy treatment. *Int Immunopharmacol* **19**, 391–8 (2014).
218. Tanabe, S. Epitope peptides and immunotherapy. *Curr Protein Pept Sci* **8**, 109–18 (2007).
219. Moldaver, D. & Larché, M. Immunotherapy with peptides. *Allergy* **66**, 784–91 (2011).
220. Reche, P. A., Fernandez-Caldas, E., Flower, D. R., Fridkis-Hareli, M. & Hoshino, Y. Peptide-based immunotherapeutics and vaccines. *J Immunol Res* **2014**, 256784 (2014).
221. Ramesh, M. *et al.* Peanut T-cell epitope discovery: Ara h 1. *J Allergy Clin Immunol* **137**, 1764–1771.e4 (2016).
222. Zubeldia, J. M., Ferrer, M., Dávila, I. & Justicia, J. L. Adjuvants in Allergen-Specific Immunotherapy: Modulating and Enhancing the Immune Response. *J Investig Allergol Clin Immunol* **29**, 103–111 (2019).
223. Gamazo, C., D'Amelio, C., Gastaminza, G., Ferrer, M. & Irache, J. M. Adjuvants for allergy immunotherapeutics. *Hum Vaccin Immunother* **13**, 2416–2427 (2017).
224. Jensen-Jarolim, E. Aluminium in Allergies and Allergen immunotherapy. *World Allergy Organ J* **8**, 7 (2015).
225. Lambrecht, B. N., Kool, M., Willart, M. A. M. & Hammad, H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol* **21**, 23–9 (2009).
226. Willhite, C. C. *et al.* Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts. *Crit Rev Toxicol* **44 Suppl 4**, 1–80 (2014).
227. Baldrick, P., Richardson, D. & Wheeler, A. W. Review of L-tyrosine confirming its safe human use as an adjuvant. *J Appl Toxicol* **22**, 333–44 (2002).



228. Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J. & Lotze, M. T. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* **249**, 158–75 (2012).
229. Netea, M. G., Van der Meer, J. W. M., Sutmoller, R. P., Adema, G. J. & Kullberg, B.-J. From the Th1/Th2 paradigm towards a Toll-like receptor/T-helper bias. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 3991–6 (2005).
230. Zhu, F.-G., Kandimalla, E. R., Yu, D. & Agrawal, S. Oral administration of a synthetic agonist of Toll-like receptor 9 potentially modulates peanut-induced allergy in mice. *J Allergy Clin Immunol* **120**, 631–7 (2007).
231. Srivastava, K. D. *et al.* Investigation of peanut oral immunotherapy with CpG/peanut nanoparticles in a murine model of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* **138**, 536–543.e4 (2016).
232. Pali-Schöll, I. *et al.* Protamine nanoparticles with CpG-oligodeoxynucleotide prevent an allergen-induced Th2-response in BALB/c mice. *Eur J Pharm Biopharm* **85**, 656–64 (2013).
233. Geijtenbeek, T. B. H. & Gringhuis, S. I. C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. *Nat Rev Immunol* **16**, 433–48 (2016).
234. Geijtenbeek, T. B. H., den Dunnen, J. & Gringhuis, S. I. Pathogen recognition by DC-SIGN shapes adaptive immunity. *Future Microbiol* **4**, 879–90 (2009).
235. Schülke, S. & Vieths, S. Dendritic cell targeting with C-type lectins for improvement of allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* **138**, 568–70 (2016).
236. Mayorga, C., Perez-Inestrosa, E., Rojo, J., Ferrer, M. & Montañez, M. I. Role of nanostructures in allergy: Diagnostics, treatments and safety. *Allergy* **76**, 3292–3306 (2021).
237. Alsaleh, N. B. & Brown, J. M. Engineered Nanomaterials and Type I Allergic Hypersensitivity Reactions. *Front Immunol* **11**, 222 (2020).
238. Manolova, V. *et al.* Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur J Immunol* **38**, 1404–13 (2008).
239. Schanen, B. C. *et al.* Immunomodulation and T helper TH₁/TH₂ response polarization by CeO₂ and TiO₂ nanoparticles. *PLoS One* **8**, e62816 (2013).
240. Moyer, T. J., Zmolek, A. C. & Irvine, D. J. Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. *J Clin Invest* **126**, 799–808 (2016).
241. Kubackova, J., Zbytovska, J. & Holas, O. Nanomaterials for direct and indirect immunomodulation: A review of applications. *Eur J Pharm Sci* **142**, 105139 (2020).



242. Le Guével, X. *et al.* Multivalent Glycosylation of Fluorescent Gold Nanoclusters Promotes Increased Human Dendritic Cell Targeting via Multiple Endocytic Pathways. *ACS Appl Mater Interfaces* **7**, 20945–56 (2015).
243. Rodriguez, M. J. *et al.* Prup 3-Epitope-based sublingual immunotherapy in a murine model for the treatment of peach allergy. *Mol Nutr Food Res* **61**, (2017).
244. Souto, E. B. *et al.* Trends in Atopic Dermatitis-From Standard Pharmacotherapy to Novel Drug Delivery Systems. *Int J Mol Sci* **20**, (2019).
245. Lee, C. C., MacKay, J. A., Fréchet, J. M. J. & Szoka, F. C. Designing dendrimers for biological applications. *Nat Biotechnol* **23**, 1517–26 (2005).
246. Mascaraque, A. *et al.* Glycodendropeptides stimulate dendritic cell maturation and T cell proliferation: a potential influenza A virus immunotherapy. *Medchemcomm* **6**, 1755–1760 (2015).
247. Ribeiro-Viana, R. *et al.* BODIPY-labeled DC-SIGN-targeting glycodendrons efficiently internalize and route to lysosomes in human dendritic cells. *Biomacromolecules* **13**, 3209–19 (2012).
248. Rolland, J. M., Gardner, L. M. & O’Hehir, R. E. Allergen-related approaches to immunotherapy. *Pharmacol Ther* **121**, 273–284 (2009).
249. Oyoshi, M. K., Oettgen, H. C., Chatila, T. A., Geha, R. S. & Bryce, P. J. Food allergy: Insights into etiology, prevention, and treatment provided by murine models. *J Allergy Clin Immunol* **133**, 309–17 (2014).
250. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**, 2348–57 (1986).
251. Romagnani, S. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol Today* **12**, 256–7 (1991).
252. Ovary, Z., Vaz, N. M. & Warner, N. L. Passive anaphylaxis in mice with gamma-G antibodies. V. Competitive effects of different immunoglobulins and inhibition of reactions with antiglobulin sera. *Immunology* **19**, 715–27 (1970).
253. Bailón, E. *et al.* A shorter and more specific oral sensitization-based experimental model of food allergy in mice. *J Immunol Methods* **381**, 41–9 (2012).
254. Salcedo, G., Sánchez-Monge, R., Barber, D. & Díaz-Perales, A. Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 781–91 (2007).



255. Díaz-Perales, A. *et al.* Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of Artemisia pollen, Castanea nut and Rosaceae fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy* **30**, 1403–10 (2000).
256. Rodriguez, M. J. *et al.* LPS promotes Th2 dependent sensitisation leading to anaphylaxis in a Pru p 3 mouse model. *Sci Rep* **7**, 40449 (2017).
257. Rodriguez, M. J. *et al.* Glycosylated nanostructures in sublingual immunotherapy induce long-lasting tolerance in LTP allergy mouse model. *Sci Rep* **9**, 4043 (2019).
258. Satam, H. *et al.* Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology (Basel)* **12**, (2023).
259. Zhong, Y., Xu, F., Wu, J., Schubert, J. & Li, M. M. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. *Ann Lab Med* **41**, 25–43 (2021).
260. Ogulur, I. *et al.* Advances and highlights in biomarkers of allergic diseases. *Allergy* **76**, 3659–3686 (2021).
261. van Ginkel, C. D., Pettersson, M. E., Dubois, A. E. J. & Koppelman, G. H. Association of STAT6 gene variants with food allergy diagnosed by double-blind placebo-controlled food challenges. *Allergy* **73**, 1337–1341 (2018).
262. Do, A. N. *et al.* Dual transcriptomic and epigenomic study of reaction severity in peanut-allergic children. *J Allergy Clin Immunol* **145**, 1219–1230 (2020).
263. Monian, B. *et al.* Peanut oral immunotherapy differentially suppresses clonally distinct subsets of T helper cells. *J Clin Invest* **132**, (2022).
264. Palacín, A. *et al.* Characterization of peach thaumatin-like proteins and their identification as major peach allergens. *Clin Exp Allergy* **40**, 1422–30 (2010).
265. Fernández-Rivas, M. *et al.* Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. *J Allergy Clin Immunol* **112**, 789–95 (2003).
266. Fernández-Rivas, M. *et al.* Randomized double-blind, placebo-controlled trial of sublingual immunotherapy with a Pru p 3 quantified peach extract. *Allergy* **64**, 876–83 (2009).
267. Palomares, F. *et al.* Pru p 3-Glycodendropeptides Based on Mannoses Promote Changes in the Immunological Properties of Dendritic and T-Cells from LTP-Allergic Patients. *Mol Nutr Food Res* **63**, e1900553 (2019).
268. Nuñez, R. *et al.* Transcriptional changes in dendritic cells underlying allergen specific induced tolerance in a mouse model. *Sci Rep* **12**, 2797 (2022).

269. Heufler, C. *et al.* Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* **26**, 659–68 (1996).
270. Gately, M. K. *et al.* Interleukin-12 antagonist activity of mouse interleukin-12 p40 homodimer in vitro and in vivo. *Ann N Y Acad Sci* **795**, 1–12 (1996).
271. Frasca, L. *et al.* IFN-gamma arms human dendritic cells to perform multiple effector functions. *J Immunol* **180**, 1471–81 (2008).
272. Gueguen, C. *et al.* Changes in markers associated with dendritic cells driving the differentiation of either TH2 cells or regulatory T cells correlate with clinical benefit during allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* **137**, 545–58 (2016).
273. Xiao, J. *et al.* Downregulation of Blimp1 inhibits the maturation of bone marrow-derived dendritic cells. *Int J Mol Med* **43**, 1094–1104 (2019).
274. Nagaoka, M. *et al.* The Orphan Nuclear Receptor NR4A3 Is Involved in the Function of Dendritic Cells. *J Immunol* **199**, 2958–2967 (2017).
275. Gungl, A. *et al.* Fra2 Overexpression in Mice Leads to Non-allergic Asthma Development in an IL-13 Dependent Manner. *Front Immunol* **9**, 2018 (2018).
276. Scholz, F. *et al.* The transcription factor C/EBP β orchestrates dendritic cell maturation and functionality under homeostatic and malignant conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 26328–26339 (2020).
277. Förster, R., Davalos-Missslitz, A. C. & Rot, A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* **8**, 362–71 (2008).
278. Li, Z. *et al.* CD83: Activation Marker for Antigen Presenting Cells and Its Therapeutic Potential. *Front Immunol* **10**, 1312 (2019).
279. Gallego, C. *et al.* CXCR4 signaling controls dendritic cell location and activation at steady state and in inflammation. *Blood* **137**, 2770–2784 (2021).
280. Heib, V. *et al.* Cytip regulates dendritic-cell function in contact hypersensitivity. *Eur J Immunol* **42**, 589–97 (2012).
281. Lin, Y.-L., Chen, S.-H. & Wang, J.-Y. Critical role of IL-6 in dendritic cell-induced allergic inflammation of asthma. *J Mol Med (Berl)* **94**, 51–9 (2016).
282. Boffa, D. J. *et al.* Selective loss of c-Rel compromises dendritic cell activation of T lymphocytes. *Cell Immunol* **222**, 105–15 (2003).
283. Dáňová, K. *et al.* NF- κ B, p38 MAPK, ERK1/2, mTOR, STAT3 and increased glycolysis regulate stability of paricalcitol/dexamethasone-generated tolerogenic dendritic cells in the inflammatory environment. *Oncotarget* **6**, 14123–38 (2015).



284. Garo, L. P. *et al.* Smad7 Controls Immunoregulatory PDL2/1-PD1 Signaling in Intestinal Inflammation and Autoimmunity. *Cell Rep* **28**, 3353-3366.e5 (2019).
285. Lukas, D. *et al.* TGF- β inhibitor Smad7 regulates dendritic cell-induced autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E1480-E1489 (2017).
286. Jin, S.-L. C. *et al.* Phosphodiesterase 4B is essential for T(H)2-cell function and development of airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* **126**, 1252-9.e12 (2010).
287. Smita, S. *et al.* Zbtb10 transcription factor is crucial for murine cDC1 activation and cytokine secretion. *Eur J Immunol* **51**, 1126-1142 (2021).
288. Sun, Z., Jiang, Q., Li, J. & Guo, J. The potent roles of salt-inducible kinases (SIKs) in metabolic homeostasis and tumorigenesis. *Signal Transduct Target Ther* **5**, 150 (2020).
289. Das, T., Chen, Z., Hendriks, R. W. & Kool, M. A20/Tumor Necrosis Factor α -Induced Protein 3 in Immune Cells Controls Development of Autoinflammation and Autoimmunity: Lessons from Mouse Models. *Front Immunol* **9**, 104 (2018).
290. Vroman, H. *et al.* Tnfaip3 expression in pulmonary conventional type 1 Langerin-expressing dendritic cells regulates T helper 2-mediated airway inflammation in mice. *Allergy* **75**, 2587-2598 (2020).
291. Lynch, K. *et al.* Regulating Immunogenicity and Tolerogenicity of Bone Marrow-Derived Dendritic Cells through Modulation of Cell Surface Glycosylation by Dexamethasone Treatment. *Front Immunol* **8**, 1427 (2017).
292. Driesen, J., Popov, A. & Schultze, J. L. CD25 as an immune regulatory molecule expressed on myeloid dendritic cells. *Immunobiology* **213**, 849-58 (2008).
293. Qi, S. *et al.* Uhrf1-Mediated Tnf- α Gene Methylation Controls Proinflammatory Macrophages in Experimental Colitis Resembling Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol* **203**, 3045-3053 (2019).
294. Obata, Y. *et al.* The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. *Nat Immunol* **15**, 571-9 (2014).
295. Schinnerling, K., García-González, P. & Aguillón, J. C. Gene Expression Profiling of Human Monocyte-derived Dendritic Cells - Searching for Molecular Regulators of Tolerogenicity. *Front Immunol* **6**, 528 (2015).
296. Imai, T. *et al.* Heat shock protein 90 (HSP90) contributes to cytosolic translocation of extracellular antigen for cross-presentation by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 16363-8 (2011).

297. Scalavino, V., Liso, M. & Serino, G. Role of microRNAs in the Regulation of Dendritic Cell Generation and Function. *Int J Mol Sci* **21**, (2020).
298. Snyder, J. P. & Amiel, E. Regulation of Dendritic Cell Immune Function and Metabolism by Cellular Nutrient Sensor Mammalian Target of Rapamycin (mTOR). *Front Immunol* **9**, 3145 (2018).
299. Sukhbaatar, N., Hengstschläger, M. & Weichhart, T. mTOR-Mediated Regulation of Dendritic Cell Differentiation and Function. *Trends Immunol* **37**, 778–789 (2016).
300. Monteverde, T. *et al.* Calcium signalling links MYC to NIAK1. *Oncogene* **37**, 982–992 (2018).
301. Wang, Y., Luan, C., Zhang, G. & Sun, C. The transcription factor cMaf is targeted by mTOR, and regulates the inflammatory response via the TLR4 signaling pathway. *Int J Mol Med* **41**, 2935–2942 (2018).
302. DeYoung, M. P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D. & Ellisen, L. W. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev* **22**, 239–51 (2008).
303. Zhu, Z. *et al.* PI3K is negatively regulated by PIK3IP1, a novel p110 interacting protein. *Biochem Biophys Res Commun* **358**, 66–72 (2007).
304. Kuerbanjiang, M. *et al.* Decreased Expression of MPC2 Contributes to Aerobic Glycolysis and Colorectal Cancer Proliferation by Activating mTOR Pathway. *J Immunol Res* **2021**, 6618837 (2021).
305. Lanna, A. *et al.* A sestrin-dependent Erk-Jnk-p38 MAPK activation complex inhibits immunity during aging. *Nat Immunol* **18**, 354–363 (2017).
306. Zhao, C. *et al.* NEIL3 may act as a potential prognostic biomarker for lung adenocarcinoma. *Cancer Cell Int* **21**, 228 (2021).
307. Tolksdorf, F. *et al.* The PDL1-inducible GTPase Arl4d controls T effector function by limiting IL-2 production. *Sci Rep* **8**, 16123 (2018).
308. Zhu, C. *et al.* OGR1 negatively regulates β -casein and triglyceride synthesis and cell proliferation via the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in goat mammary epithelial cells. *Anim Biotechnol* **32**, 627–636 (2021).
309. Sengupta, S. & Haczku, A. Targeting I κ BNS in allergic asthma: where it resides, matters. *Allergy* **72**, 1003–1005 (2017).
310. Hirata, N. *et al.* Dendritic cell-derived TNF- α is responsible for development of IL-10-producing CD4⁺ T cells. *Cell Immunol* **261**, 37–41 (2010).



311. Hong, C.-H., Lin, S.-H. & Lee, C.-H. CCL21 Induces mTOR-dependent MALAT1 Expression, Leading to Cell Migration in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *In Vivo* **33**, 793–800 (2019).
312. Wu, J. *et al.* The Long Noncoding RNA MALAT1 Induces Tolerogenic Dendritic Cells and Regulatory T Cells via miR155/Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3 Grabbing Nonintegrin/IL10 Axis. *Front Immunol* **9**, 1847 (2018).
313. Ahmad, S. *et al.* The Key Role of TNF-TNFR2 Interactions in the Modulation of Allergic Inflammation: A Review. *Front Immunol* **9**, 2572 (2018).
314. Krause, K., Metz, M., Makris, M., Zuberbier, T. & Maurer, M. The role of interleukin-1 in allergy-related disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **12**, 477–84 (2012).
315. Tang, H. *et al.* MicroRNA-106b regulates pro-allergic properties of dendritic cells and Th2 polarisation by targeting early growth response-2 in vitro. *Int Immunopharmacol* **28**, 866–74 (2015).
316. Mendes, K. *et al.* The epigenetic pioneer EGR2 initiates DNA demethylation in differentiating monocytes at both stable and transient binding sites. *Nat Commun* **12**, 1556 (2021).
317. Xing, Y. *et al.* ZNF692 promotes colon adenocarcinoma cell growth and metastasis by activating the PI3K/AKT pathway. *Int J Oncol* **54**, 1691–1703 (2019).
318. Ferreira, G. B. *et al.* Vitamin D3 Induces Tolerance in Human Dendritic Cells by Activation of Intracellular Metabolic Pathways. *Cell Rep* **10**, 711–725 (2015).
319. Ono, A. *et al.* Comparative effects of PP242 and rapamycin on mTOR signalling and NOTCH signalling in leukemia cells. *Anticancer Res* **33**, 809–13 (2013).
320. Wu, X.-N. *et al.* Phosphorylation of Raptor by p38beta participates in arsenite-induced mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activation. *J Biol Chem* **286**, 31501–11 (2011).
321. Zhao, F. *et al.* Activation of p38 mitogen-activated protein kinase drives dendritic cells to become tolerogenic in ret transgenic mice spontaneously developing melanoma. *Clin Cancer Res* **15**, 4382–90 (2009).
322. Di Nardo, A. *et al.* Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization. *J Immunol* **178**, 1829–34 (2007).
323. Thatcher, T. H. *et al.* Endogenous ligands of the aryl hydrocarbon receptor regulate lung dendritic cell function. *Immunology* **147**, 41–54 (2016).

324. Cañas, J. A. *et al.* Epigenetics in Food Allergy and Immunomodulation. *Nutrients* **13**, (2021).
325. Núñez, R. *et al.* Methylation changes induced by a glycodendropeptide immunotherapy and associated to tolerance in mice. *Front Immunol* **13**, (2022).
326. Goriely, S., Cavoy, R. & Goldman, M. Interleukin-12 family members and type I interferons in Th17-mediated inflammatory disorders. *Allergy* **64**, 702–9 (2009).
327. Döffinger, R. *et al.* Inheritable defects in interleukin-12- and interferon-gamma-mediated immunity and the TH1/TH2 paradigm in man. *Allergy* **54**, 409–12 (1999).
328. Prigione, I. *et al.* Interferon-gamma and IL-10 may protect from allergic polysensitization in children: preliminary evidence. *Allergy* **65**, 740–2 (2010).
329. Eguiluz-Gracia, I. *et al.* Recent developments and highlights in biomarkers in allergic diseases and asthma. *Allergy* **73**, 2290–2305 (2018).
330. Ohno, T., Morita, H., Arae, K., Matsumoto, K. & Nakae, S. Interleukin-33 in allergy. *Allergy* **67**, 1203–14 (2012).
331. Van Den Eeckhout, B., Tavernier, J. & Gerlo, S. Interleukin-1 as Innate Mediator of T Cell Immunity. *Front Immunol* **11**, 621931 (2020).
332. Wesa, A. K. & Galy, A. IL-1 beta induces dendritic cells to produce IL-12. *Int Immunol* **13**, 1053–61 (2001).
333. Yu, X. *et al.* Enhanced cytotoxicity of IL-24 gene-modified dendritic cells co-cultured with cytokine-induced killer cells to hepatocellular carcinoma cells. *Int J Hematol* **92**, 276–82 (2010).
334. Zelante, T., Fric, J., Wong, A. Y. W. & Ricciardi-Castagnoli, P. Interleukin-2 production by dendritic cells and its immuno-regulatory functions. *Front Immunol* **3**, 161 (2012).
335. van den Elsen, P. J. Expression regulation of major histocompatibility complex class I and class II encoding genes. *Front Immunol* **2**, 48 (2011).
336. Andris, F. *et al.* The Transcription Factor c-Maf Promotes the Differentiation of Follicular Helper T Cells. *Front Immunol* **8**, 480 (2017).
337. Neely, J. L. *et al.* GATA-3 and T-bet as diagnostic markers of non-esophageal eosinophilic gastrointestinal disease. *Allergy* **77**, 1042–1044 (2022).
338. Novoszel, P. *et al.* The AP-1 transcription factors c-Jun and JunB are essential for CD8 α conventional dendritic cell identity. *Cell Death Differ* **28**, 2404–2420 (2021).
339. Sareneva, T., Julkunen, I. & Matikainen, S. IFN-alpha and IL-12 induce IL-18 receptor gene expression in human NK and T cells. *J Immunol* **165**, 1933–8 (2000).



340. Nold-Petry, C. A. *et al.* Increased cytokine production in interleukin-18 receptor alpha-deficient cells is associated with dysregulation of suppressors of cytokine signaling. *J Biol Chem* **284**, 25900–11 (2009).
341. Togbe, D. *et al.* Nonredundant roles of TIRAP and MyD88 in airway response to endotoxin, independent of TRIF, IL-1 and IL-18 pathways. *Lab Invest* **86**, 1126–35 (2006).
342. Strickland, A. B. *et al.* IL-27 Signaling Promotes Th1 Responses and Is Required to Inhibit Fungal Growth in the Lung during Repeated Exposure to *Aspergillus fumigatus*. *Immunohorizons* **6**, 78–89 (2022).
343. Trujillo-Ocampo, A. *et al.* IL-7 During Antigenic Stimulation Using Allogeneic Dendritic Cells Promotes Expansion of CD45RA-CD62L+CD4+ Invariant NKT Cells With Th-2 Biased Cytokine Production Profile. *Front Immunol* **11**, 567406 (2020).
344. Van Acker, H. H. *et al.* Interleukin-15-Cultured Dendritic Cells Enhance Anti-Tumor Gamma Delta T Cell Functions through IL-15 Secretion. *Front Immunol* **9**, 658 (2018).
345. Mattei, F., Schiavoni, G., Belardelli, F. & Tough, D. F. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *J Immunol* **167**, 1179–87 (2001).
346. Tang, Z. *et al.* Characterization of novel and large fragment deletions in exon 1 of the IL10RA gene in Chinese children with very early onset inflammatory bowel diseases. *BMC Gastroenterol* **21**, 167 (2021).
347. Gringhuis, S. I. *et al.* C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity* **26**, 605–16 (2007).
348. Bieber, T. Interleukin-13: Targeting an underestimated cytokine in atopic dermatitis. *Allergy* **75**, 54–62 (2020).
349. Debets, R. *et al.* IL-18 receptors, their role in ligand binding and function: anti-IL-1RAcPL antibody, a potent antagonist of IL-18. *J Immunol* **165**, 4950–6 (2000).
350. Chamilos, G. *et al.* Generation of IL-23 producing dendritic cells (DCs) by airborne fungi regulates fungal pathogenicity via the induction of T(H)-17 responses. *PLoS One* **5**, e12955 (2010).
351. Platzer, B. *et al.* IgE/FcεRI-Mediated Antigen Cross-Presentation by Dendritic Cells Enhances Anti-Tumor Immune Responses. *Cell Rep* **10**, 1487–1495 (2015).

352. Romantowski, J. *et al.* IFNG, FCER1A, PCDHB10 expression as a new potential marker of efficacy in grass pollen allergen-specific immunotherapy. *Postepy Dermatol Alergol* **38**, 665–672 (2021).
353. Mahmud, S. A., Manlove, L. S. & Farrar, M. A. Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function. *JAKSTAT* **2**, e23154 (2013).
354. Meyer, P. *et al.* Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *EMBO J* **23**, 1402–10 (2004).
355. Imbratta, C., Hussein, H., Andris, F. & Verdeil, G. c-MAF, a Swiss Army Knife for Tolerance in Lymphocytes. *Front Immunol* **11**, 206 (2020).
356. Núñez, R. *et al.* A synthetic glycodendropeptide induces methylation changes on regulatory T cells linked to tolerant responses in anaphylactic-mice. *Front Immunol* **14**, 1165852 (2023).
357. Cuadrado, E. *et al.* Proteomic Analyses of Human Regulatory T Cells Reveal Adaptations in Signaling Pathways that Protect Cellular Identity. *Immunity* **48**, 1046-1059.e6 (2018).
358. Shin, H.-J. *et al.* STAT4 expression in human T cells is regulated by DNA methylation but not by promoter polymorphism. *J Immunol* **175**, 7143–50 (2005).
359. Lal, G. & Bromberg, J. S. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood* **114**, 3727–35 (2009).
360. Cosovanu, C. & Neumann, C. The Many Functions of Foxp3+ Regulatory T Cells in the Intestine. *Front Immunol* **11**, 600973 (2020).
361. Mondoulet, L. *et al.* Gata3 hypermethylation and Foxp3 hypomethylation are associated with sustained protection and bystander effect following epicutaneous immunotherapy in peanut-sensitized mice. *Allergy* **74**, 152–164 (2019).
362. Wang, Y., Su, M. A. & Wan, Y. Y. An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells. *Immunity* **35**, 337–48 (2011).
363. Lan, F., Zhang, N., Bachert, C. & Zhang, L. Stability of regulatory T cells in T helper 2-biased allergic airway diseases. *Allergy* **75**, 1918–1926 (2020).
364. Mahmud, S. A., Manlove, L. S. & Farrar, M. A. Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function. *JAKSTAT* **2**, e23154 (2013).
365. Zheng, S. G., Wang, J. & Horwitz, D. A. Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6. *J Immunol* **180**, 7112–6 (2008).
366. Morales, J. K., Falanga, Y. T., Depcrynski, A., Fernando, J. & Ryan, J. J. Mast cell homeostasis and the JAK-STAT pathway. *Genes Immun* **11**, 599–608 (2010).



367. Ray, A., Khare, A., Krishnamoorthy, N., Qi, Z. & Ray, P. Regulatory T cells in many flavors control asthma. *Mucosal Immunol* **3**, 216–29 (2010).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ANEXOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ARTÍCULO 1

Transcriptional changes in dendritic cells underlying allergen specific induced tolerance in a mouse model



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Nuñez R, Rodriguez MJ, Palomares F, Gomez F, Jabato FM, Cordoba-Caballero J, Seoane P, Losada J, Rojo J, Torres MJ, Perkins JR, Mayorga C. Transcriptional changes in dendritic cells underlying allergen specific induced tolerance in a mouse model. *Sci Rep* **12**, 2797 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06186-8>

Abstract

To investigate food allergy-tolerance mechanisms induced through allergen-specific immunotherapy we used RNA-Sequencing to measure gene expression in lymph-node-derived dendritic cells from Pru p 3-anaphylactic mice after immunotherapy with glycodendropeptides at 2 nM and 5 nM, leading to permanent tolerance and short-term desensitization, respectively. Gene expression was also measured in mice receiving no immunotherapy (anaphylaxis); and in which anaphylaxis could never occur (antigen-only). Compared to anaphylaxis, the antigen-only group showed the greatest number of expression-changes (411), followed by tolerant (186) and desensitized (119). Only 29 genes changed in all groups, including *Il12b*, *Cebpb* and *Ifngr1*. The desensitized group showed enrichment for genes related to chronic inflammatory response, secretory granule, and regulation of interleukin-12 production; the tolerant group showed genes related to cytokine receptor activity and glucocorticoid receptor binding, suggesting distinct pathways for similar outcomes. We identified genes and processes potentially involved in the restoration of long-term tolerance via allergen-specific immunotherapy, representing potential prognostic biomarkers.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ARTÍCULO 2

Methylation changes induced by a glycodendropeptide immunotherapy and associated to tolerance in mice



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Núñez R, Rodríguez MJ, Lebrón-Martín C, Martín-Astorga MDC, Palomares F, Ramos-Soriano J, Rojo J, Torres MJ, Cañas JA, Mayorga C. Methylation changes induced by a glycodendropeptide immunotherapy and associated to tolerance in mice. *Frontiers in Immunology* **13**, (2022). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1094172>

Abstract

Introduction: Allergen-specific immunotherapy (AIT) is applied as treatment to rise tolerance in patients with food allergies. Although AIT is thoroughly used, the underlying epigenetic events related to tolerant induction are still unknown. Thus, we aim to investigate epigenetic changes that could be related to tolerance in dendritic cells (DCs) from anaphylactic mice to lipid transfer proteins, Pru p 3, in the context of a sublingual immunotherapy (SLIT) with a glycodendropeptide (D1ManPrup3) that has demonstrated tolerant or desensitization responses depending on the treatment dose.

Methods: Changes in DNA methylation in CpG context were determined comparing Sensitized (Antigen-only) animals and two groups receiving SLIT with the D1ManPrup3 nanostructure (D1ManPrup3-SLIT): Tolerant (2nM D1ManPrup3) and Desensitized (5nM D1ManPrup3), against anaphylactic animals. DNA from lymph nodes-DCs were isolated and then, Whole Genome Bisulphite Sequencing was performed to analyze methylation.

Results: Most differentially methylated regions were found on the area of influence of gene promoters (DMPRs). Compared to the Anaphylactic group, the highest value was found in Desensitized mice (n = 7,713 DMPRs), followed by Tolerant (n = 4,091 DMPRs) and Sensitized (n = 3,931 DMPRs) mice. Moreover, many of these epigenetic changes were found in genes involved in immune and tolerance responses (Il1b, Il12b, Il1a, Ifng, and Tnf) as shown by functional enrichment (DCs regulation, B cell-mediated immunity, and effector mechanisms).

Discussion: In conclusion, different doses of D1ManPrup3-SLIT induce different DNA methylation changes, which are reflected in the induction of distinct responses, tolerance, or desensitization.

ARTÍCULO 3

A synthetic glycodendropeptide induces methylation changes on regulatory T cells linked to tolerant responses in anaphylactic mice



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Núñez R, Rodríguez MJ, Lebrón-Martín C, Martín-Astorga MDC, Ramos-Soriano J, Rojo J, Torres MJ, Cañas JA, Mayorga C. A synthetic glycodendropeptide induces methylation changes on regulatory T cells linked to tolerant responses in anaphylactic-mice. *Frontiers in Immunology* **14**, (2023).

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1165852>

Abstract

Introduction: Lipid transfer proteins (LTPs) are allergens found in a wide range of plant-foods. Specifically, Pru p 3, the major allergen of peach, is commonly responsible for severe allergic reactions. The need for new alternatives to conventional food allergy treatments, like restrictive diets, suggests allergen immunotherapy as a promising option. It has been demonstrated that sublingual immunotherapy (SLIT) with synthetic glycodendropeptides, such as D1ManPrup3, containing mannose and Pru p 3 peptides induced tolerance in mice and that the persistence of this effect depends on treatment dose (2nM or 5nM). Moreover, it produces changes associated with differential gene expression and methylation profile of dendritic cells, as well as phenotypical changes in regulatory T cells (Treg). However, there are no works addressing the study of epigenetic changes in terms of methylation in the cell subsets that sustain tolerant responses, Treg. Therefore, in this work, DNA methylation changes in splenic-Treg from Pru p 3 anaphylactic mice were evaluated.

Methods: It was performed by whole genome bisulphite sequencing comparing SLIT-D1ManPrup3 treated mice: tolerant (2nM D1ManPrup3), desensitized (5nM D1ManPrup3), and sensitized but not treated (antigen-only), with anaphylactic mice.

Results: Most of the methylation changes were found in the gene promoters from both SLIT-treated groups, desensitized (1,580) and tolerant (1,576), followed by the antigen-only (1,151) group. Although tolerant and desensitized mice showed a similar number of methylation changes, only 445 genes were shared in both. Remarkably, interesting methylation changes were observed on the promoter regions of critical transcription factors for Treg function like Stat4, Stat5a, Stat5b, Foxp3, and Gata3. In fact, Foxp3 was observed exclusively as hypomethylated in tolerant group, whereas Gata3 was only hypomethylated in the desensitized mice.

Discussion: In conclusion, diverse D1ManPrup3 doses induce different responses (tolerance or desensitization) in mice, which are reflected by differential methylation changes in Tregs.

COMUNICACIONES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

741 Allergen Specific Immunotherapy Leads To Multiple Transcriptional Changes In A Peach Allergy Mouse Model



Maria Rodriguez-Sanchez¹, Rafael Núñez², James Perkins², Alba Rodriguez-Nogales², Ana Molina Bueno², Maria Francisca Palomares Jerez, PhD², Francisco Rojo, PhD³, Maria Torres Jaen, MD PhD FAAAAI⁴, Cristobalina Mayorga, PhD⁵; Allergy Research Group, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA. ¹Departamento de Medicina, Universidad de Málaga, ²Allergy Research Group, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA, ³Glycosystems Laboratory, Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ), CSIC - Universidad de Sevilla, ⁴Allergy Research Group, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA. Dpto. de Medicina, Universidad de Málaga. Allergy Unit, Hospital Regional Universitario de Málaga, Spain, ⁵Allergy Research Group, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA. Allergy Unit, Hospital Regional Universitario de Málaga.

RATIONALE: Allergen-specific immunotherapy (IT) induces tolerance in food allergy. Immunological changes during IT have been investigated, however little work has looked at global gene-expression changes. We have developed a tolerance-model of peach allergy using a novel system of sublingual IT (SLIT) based on glycodendropeptides. We analysed changes in dendritic cells (DCs) from mice receiving SLIT.

METHODS: RNA-Seq was used to profile transcriptional changes in lymph node DCs for mice from two groups: anaphylactic mice treated with 2nM SLIT (tolerant), anaphylactic mice treated with 5nM SLIT (desensitized) and two controls: sensitized and anaphylactic mice. Mice were challenged intraperitoneally with Pru p 3, then sacrificed. Poly(A) enriched RNA sequencing was performed using Illumina HiSeq (100bp, paired end); sequences were aligned to the mouse genome using STAR. Differential expression analysis was performed using DESeq2 and functional enrichment analysis using TopGO.

RESULTS: Gene expression for the sensitized, desensitized and tolerant mice groups were compared with anaphylactic samples. Sensitized mice showed the largest number of changes, followed by desensitized, then tolerant mice. Nevertheless, there was a set of core genes that changed in all comparisons. In terms of functional enrichment analysis, there was an overrepresentation of genes involved in the innate immune response, regulation of T-cell proliferation and TNF signaling. Interestingly, genes belonging to the MHC-II complex showed altered expression in different groups.

CONCLUSIONS: By exploring gene expression at the global level we are able to obtain insights into the transcriptional changes and cellular processes that occur during immunotherapy. Future work is needed to further investigate these changes.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

083 Cardiovascular Changes during Oral Food Challenge and Drug Provocation Test in Children Detected by Noninvasive Hemodynamic Monitoring



Tharida Khongcharoensombat, MD¹, Pantipa Chatchatee¹, Aisawan Petchlorlian², Jarungchit Ngamphaiboon¹, Parichat Khaosut¹, Rapisa Nantanece, MD¹, Narissara Suratannon¹, Pannipa Kittipongpattana¹; ¹Center of Excellence for Allergy and Clinical Immunology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand, ²Division of Geriatric Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

RATIONALE: The prompt recognition of allergic reactions during oral food and drug challenge (OFC/DPT) in children is crucial. Non-invasive hemodynamic monitoring may help in early detection of the reactions. We sought to describe cardiovascular changes and test their performance in predicting the reaction during OFC/DPT.

METHODS: Patients aged under 18 years who undergoing OFC/DPT from November 2021 to August 2022 and monitored by the non-invasive monitoring device were recruited. Real-time changes in heart rate (HR), stroke volume (SV), systemic vascular resistance (SVR), and cardiac output (CO) were evaluated. All parameters were normalized by mean and standard deviation (SD) at baseline of each patient. The onset of positive reaction (OPR) was defined as the time when allergic reactions fulfilled the stopping criteria.

RESULTS: We enrolled 18 patients with median age of 5.5 years (IQR 2.8-7.1). Seven patients had positive OFC/DPT. At OPR, increase in mean of HR, SV, and CO; increase in SD of HR and SV; decrease in mean of SVR; and decrease in SD of SVR and CO were observed. The SD of HR significantly increased at 10 minutes prior to OPR by 0.47 times of SD (95%CI 0.07-1.09, $p=0.03$). The predictive parameters for OPR were as followed: increased SD of HR (AUC 0.67, 95%CI 0.60-0.75) at 10 minutes, decreased mean of SV (AUC 0.67, 95%CI 0.60-0.73) at 20 minutes, and increased mean of HR (AUC 0.75, 95%CI 0.66-0.84) at 30 minutes.

CONCLUSIONS: Cardiovascular changes could be observed at least 10 minutes before the reaction. Hemodynamic monitoring might improve patients' safety during OFC/DPT.

084 Sublingual Immunotherapy With A Synthetic Dendritic Pru p 3 Nanosystem Induces Changes In DNA Methylation In Allergic Mice



José Cañas, PhD¹, Rafael Núñez², María Rodríguez², Francisca Palomares², María del Carmen Martín-Astorga³, Clara Lebrón-Martín², Ana Molina Bueno², Juan París¹, Anyith Cruz-Amaya², María Torres⁴, Cristobalina Mayorga⁵; ¹Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Málaga, Spain; Andalusian Centre for Nanomedicine and Biotechnology-BIONAND, Málaga, Spain, ²Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Málaga, Spain, ³Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Málaga, Spain; Universidad de Málaga (UMA), ⁴Hospital Regional Universitario de Málaga, Málaga, Spain; Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Málaga, Spain; Universidad de Málaga (UMA), Málaga, Spain, ⁵Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Málaga, Spain; Hospital Regional Universitario de Málaga, Málaga, Spain.

RATIONALE: Allergen immunotherapy (AIT) in food allergy is used to induce tolerance. In peach allergy, dendritic nanosystems including Pru p 3 peptides and mannose adjuvants (D1ManPrup3) trigger tolerant or desensitization responses depending on the dose, as previously demonstrated. Although AIT outcome may influence epigenetic changes, no previous studies have addressed this question. We aimed to investigate DNA methylation and their long-term effect on gene expression during AIT in a model of peach anaphylaxis.

METHODS: Whole genome bisulphite sequencing was used to evaluate methylation changes in DNA of dendritic cells from lymph nodes in different BALB/c mice groups: anaphylactic non-treated with sublingual

immunotherapy (SLIT) (Group A), SLIT-treated using D1ManPrup3 2nM (Group B-Tolerant) or 5 nM (Group C-Desensitized) and Pru p 3 sensitized but non-anaphylactic mice (Group D).

RESULTS: Most methylation changes were found on differentially methylated regions on the area of influence of gene promoters (DMPRs). Compared to the anaphylactic group (Group A), the highest value was found in Group C-Desensitized mice ($n=7713$ DMPRs), followed by Group B-Tolerant ($n=4091$ DMPRs) and non-anaphylactic (Group D, $n=3931$ DMPRs) mice. These values correlated negatively with long-term development of Pru p 3-induced anaphylaxis. Most epigenetic changes were found in genes involved in immune and tolerance responses (*Il1b*, *Il12b*, *Il1a*, *Ifng*, and *Tnf*) as shown by functional enrichment (dendritic cells regulation, B cell-mediated immunity, and effector mechanisms).

CONCLUSIONS: SLIT with different doses of D1ManPrup3 produces different responses, tolerance or desensitization, that are reflected in the induction of different DNA methylation changes.

085 Efficacy and Safety of Epicutaneous Immunotherapy (EPIT) for Peanut Allergy in Subjects Aged 1-3 Years With and Without Atopic Dermatitis in the EPITOPE Study



Amy Scurlock, MD, FAAAAI¹, Katharine Bee, PhD², Hugh Sampson, MD FAAAAI³, Jonas Meney², Henry Bahnson², A. Wesley Burks, MD FAAAAI⁴; ¹University of Arkansas for Medical Sciences and Arkansas Children's Hospital, Little Rock, AR, USA, ²DBV Technologies, ³Icahn School of Medicine at Mount Sinai, The Elliot and Roslyn Jaffe Food Allergy Institute, New York, NY, USA, ⁴Division of Pediatric Allergy and Immunology, Department of Pediatrics, University of North Carolina School of Medicine, Chapel Hill, NC, USA.

RATIONALE: In a Phase 3 double-blind, placebo-controlled clinical trial of 1-3-year-old peanut-allergic children (EPITOPE), EPIT with Viaskin Peanut 250 µg patch (VP250) reduced reactivity to peanut ingestion. We explored whether treatment response or safety was influenced by baseline atopic dermatitis (AD) in this population.

METHODS: 362 subjects were randomized to VP250 ($n=244$) or placebo ($n=118$). The primary outcome was defined according to eliciting dose at Month 12 double-blind placebo-controlled food challenge, with missing primary endpoint data analyzed using multiple imputation. Efficacy and safety outcomes were assessed in children with and without AD (including "eczema").

RESULTS: AD at study entry was common: 290 subjects (80.1%) with AD and 72 (19.9%) without. In subjects with AD at study entry, the response rate was 66.7% (VP250) vs 32.2% (placebo); risk difference: 34.5% (95%CI: 22.11, 46.88). In subjects without AD, the response rate was 68.8% (VP250) vs 40.9% (placebo); risk difference: 27.9% (95%CI: 2.90, 52.84).

Serious treatment-emergent adverse events (TEAEs) assessed as related to VP250 did not occur in any subject with AD and in one (2%) subject without AD. TEAEs leading to permanent study discontinuation (assessed as VP250 treatment-related) occurred in 6 (3.1%) subjects with AD and 2 (4.0%) subjects without AD. Rates of local VP250-induced TEAEs (any and severe) were similar between subjects with and without AD (99.5% vs 100%; 23.2% vs 20%), respectively.

CONCLUSIONS: Efficacy assessments were consistently in favor of VP250 vs placebo, irrespective of ongoing AD status at study entry. Safety assessments were similar between subjects with and without AD at study entry.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Fri 27 Jan
17:20 - 19:00

Oral Presentations II
Oral Abstracts

Chair : Thomas Weichhart (Austria), Franziska Roth-Walter (Austria)

17:20
005 **Birch pollen-derived low molecular weight compounds decrease cAMP signaling in the human bronchial epithelial cell line 16HBE14o-**
Srinidhi Sudharson (Austria)

17:45
006 **Microbial-Derived Tryptophan Metabolites Selectively Inhibit TH2 Cytokine Secretion by Polarized Human Lymphocytes**
Lu Yao (Ireland)

18:10
007 **A synthetic dendrimeric Pru p 3 nanosystem induces methylation changes in mice suggesting tolerance or desensitisation**
José Antonio Cañas (Spain)

18:35
008 **In vivo and in vitro therapeutic effects of resveratrol on food allergy**
Hang Du (China)



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

< Back

EAACI Hybrid Congress
9-11 June - Hamburg, Germany



2023



📅 Saturday 10 June

EAACI 2023

13:15 - 14:45 | **OAS 16 - Safety and prediction of allergen immunotherapy**
Hall Y 05+06
ORAL Session

Chair: Ümit şahiner (*Türkiye*)

Enrico Heffler (*Italy*)

13:15 | **IgE and IgG4 antibody responses to Der p 23 in patients with atopic dermatitis: do they have a role in efficacy of sublingual immunotherapy?**

001502

Sarah Langer (*Brazil*), Edine Pimentel (*Brazil*), Maria Eduarda Trocoli Zanetti (*Brazil*), Marina Dias (*Brazil*), Melo Janaina (*Brazil*), Orlando Neto (*Brazil*), Mariana Ferriani (*Brazil*), Jorgete Silva (*Brazil*), Persio Roxo (*Brazil*), Davi Aragon (*Brazil*), Luisa Karla Arruda (*Brazil*)

13:27 | **IL10 serum levels at second treatment year: a new potential biomarker for disease modification in AIT**

000483

Maria Isabel Delgado-Dolset (*Spain*), Raphaëlle Bazire (*Spain*), Paloma Fernández (*Spain*), Sonia Vázquez-Cortés (*Spain*), Tania Ramos (*Spain*), María Del Pilar Rico (*Spain*), Maria Marta Escribese (*Spain*), Montserrat Fernández-Rivas (*Spain*), Carlos Blanco (*Spain*), Domingo Barber (*Spain*)

13:39 | **Induced methylation changes by sublingual immunotherapy with a dendrimeric Pru p 3 glycodendropeptide in anaphylactic mice**

000964

Rafael Nuñez (*Spain*), José Antonio Cañas (*Spain*), María José Rodríguez (*Spain*), Juan Luis Paris (*Spain*), Clara Lebrón-Martín (*Spain*), María Del Carmen Martín-Astorga (*Spain*), Carlos Jose Aranda (*Spain*), Ana Molina (*Spain*), Anyith Cruz-Amaya (*Spain*), Maria Jose Torres (*Spain*), Cristobalina Mayorga (*Spain*)

13:51 | **The influence of oral immunotherapy for food allergy on the expression of CD300 receptors on myeloid cells**

000714

Naama Epstein-Rigbi (*Israel*), Michael Goldberg (*Israel*), Michael Levy (*Israel*), Liat Nachshon (*Israel*), Yael Koren (*Israel*), Arnon Elizur (*Israel*), Michal Itan (*Israel*), Ariel Munitz (*Israel*)

14:03 | **Consistent efficacy and safety of SQ grass, tree, ragweed and house dust mite sublingual immunotherapy (SLIT)-tablets**

001089

Stephen R. Durham (*United Kingdom*), David Bernstein (*United States of America*), Veronica Hulstrøm (*Denmark*), Yuriko Maekawa (*Japan*), Tomokazu Matsuoka (*Japan*), Josefine Nolte (*Denmark*), Hendrik Nolte (*United States of America*), Peter Sejer Andersen (*Denmark*), Thomas Stranzl (*Denmark*)

14:15 | **Effectiveness and safety using a depigmented, polymerized extract of cat epithelium: A real-world study**

001451

Jose Julio Laguna Martinez (*Spain*), Arancha Jimenez (*Spain*), Rosario Gonzalez-Mendiola (*Spain*), Cosmin Boteanu (*Spain*), Javier Dionicio (*Spain*), Aida Gomez-cardenosa (*Spain*), Monica Ruiz-garcia (*Spain*)

14:27 | **PVX108 – A Peptide Immunotherapy for Peanut Allergy Safely Induces Durable Immune Changes in Peanut-Allergic Adults**

001176

Astrid Voskamp (*New Zealand*), Sugandhika Khosa (*United States of America*), Hannah Deberg (*United States of America*), Jennifer Rolland (*Australia*), Robyn O'hehir (*Australia*), Pascal Hickey (*Australia*), Erik Wambre (*United States of America*), Sara Prickett (*Australia*)