



POLITÉCNICA



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA

AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

***Búsqueda de nuevos marcadores y
bases moleculares de la anafilaxia:
miRNAs y vesículas extracelulares***

TRABAJO FIN DE GRADO

Autor: Benigno Rivas Pardo

Tutor: Vanesa Esteban Vázquez

Cotutora: Gema López Torrejón

Septiembre de 2020



POLITÉCNICA



E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

**BÚSQUEDA DE NUEVOS MARCADORES Y BASES MOLECULARES DE LA ANAFILAXIA:
miRNAs y VESÍCULAS EXTRACELULARES**

TRABAJO FIN DE GRADO

Benigno Rivas Pardo

MADRID, 2020

Directora: **Vanesa Esteban Vázquez**

Investigadora

Dpto. de Inmunología y alergia, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz



POLITÉCNICA



E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

**TITULO DEL TFG- BÚSQUEDA DE NUEVOS MARCADORES Y BASES
MOLECULARES DE LA ANAFILAXIA: miRNAs Y VESÍCULAS EXTRACELULARES**

Memoria presentada por *Benigno Rivas Pardo* para la obtención del título de Graduado en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Madrid

Fdo: Benigno Rivas Pardo

VºBº Tutor

Dra. Vanesa Esteban Vázquez

Investigadora

Dpto. de Inmunología y alergia

Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz

VºBº Tutor UPM

**Gema
Lopez
Torrejon**

Digitally signed by Gema
Lopez Torrejon
DN: cn=Gema Lopez
Torrejon, o, ou,
email=gema.lopez@upm.es,
c=ES
Date: 2020.09.14 09:19:21
+02'00'

Dra. Gema López Torrejón

Profesora Ayudante Doctor

Dpto. de Biotecnología-Biología Vegetal

ETSIAAB - Universidad Politécnica de Madrid

Madrid, 16 de septiembre de 2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, muchas gracias a mi directora Vanesa Esteban por haberme permitido realizar este trabajo con ella a pesar de que la situación actual no nos haya permitido hacer el trabajo que hubiésemos querido. Gracias también a Emilio por todas sus correcciones, a pesar de que no le gusten las chicas con las que le intento juntar. No puedo olvidarme de mis compis Sergio y Nuria, que me hacían los días en el laboratorio mucho más amenos, y tampoco de Tamara, que me enseñó casi todo lo que he aprendido y cantaba conmigo Ojete Calor cuando estábamos aburridos.

Gracias a mi familia y amigos por haberme cuidado desde el primer momento y haber estado a mi lado todo este tiempo. Soy quien soy gracias a vosotros y eso es más importante que cualquier otra cosa. Espero que nunca os separéis de mí y poder seguir creciendo rodeados por vosotros. Gracias especialmente a Marina por todo su amor y apoyo durante los últimos 2 años y 8 meses y haberme hecho mi vida en Madrid mucho más sencilla. Ojalá podamos cumplir pronto el sueño frustrado de ir a Japón, donde tendríamos que estar en el momento en el que estoy escribiendo esto si no hubiese sido por la COVID19.

Por último y no menos importante, muchas gracias a Luis Alberto Samartín, mi profesor de biología en el instituto. Desde los 13 años me ha inculcado su amor por la biología y me ha guiado en todo mi proceso de crecimiento y aprendizaje, y si no hubiese sido por sus consejos probablemente no me encontraría donde estoy a día de hoy.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2: ANAFILAXIA	2
2.1 Epidemiología y etiología	2
2.2 Fisiopatología y mediadores implicados en anafilaxia.....	2
2.3 Diagnóstico	6
2.4 Tratamiento	7
CAPÍTULO 3: microRNAs	9
3.1 Formación y acción de los microRNAs	9
3.2 miRNAs: Bases moleculares en enfermedades alérgicas.....	10
3.3 miRNAs: Biomarcadores de enfermedades alérgicas	15
CAPÍTULO 4: VESÍCULAS EXTRACELULARES	17
4.1 Formación y acción de las vesículas extracelulares	17
4.2 Vesículas extracelulares: Bases moleculares en enfermedades alérgicas	18
4.3 Vesículas extracelulares: biomarcadores de enfermedades alérgicas	20
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	22
BIBLIOGRAFÍA	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios clínicos para el diagnóstico de la anafilaxia.....	7
Tabla 2. Funciones de los miRNAs en enfermedades alérgicas.....	11

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cambios fisiopatológicos en anafilaxia y mediadores implicados	3
Figura 2. Mecanismo molecular de la alergia	4
Figura 3. Biogénesis de miRNAs y mecanismo de acción	10
Figura 4. Biogénesis de microvesículas y exosomas	18

LISTA DE ABREVIATURAS

AGO - Proteínas argonauta	Nt - Nucleótidos
Akt - Proteína kinasa B	OBF1 – <i>Oct binding factor 1</i>
BALF - Fluido de lavado broncoalveolar, del inglés <i>Broncoalveolar lavage fluid</i>	OVA – Ovoalbúmina
CDs - Células dendríticas	PAF - Factor de agregación plaquetario, del inglés <i>Platelet-activating factor</i>
BECs - Células epiteliales bronquiales, del inglés <i>Bronchial epithelial cells</i>	PAFR – Receptor de PAF
CTLA4 - <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>	PF4 – Factor plaquetario 4, del inglés <i>Platelet factor 4</i>
CysLTs - Cisteinil leucotrienos	PI3k - Fosfatidilinositol-3-kinasa
CPA – Célula presentadora de antígenos	PKIα - <i>Protein Kinase Inhibitor α</i>
DA - Dermatitis atópica	PSA – Anafilaxia sistémica pasiva, del inglés <i>Passive systemic anaphylaxis</i>
eNOS – óxido nítrico sintasa endotelial	PTEN - Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
EoE – Esofagitis eosinofílica	RISC - <i>RNA-induced silencing complex</i>
ESCRT - <i>Endosomal sorting complex required for transport</i>	S1pr1 – Receptor de la esfingosina 1-fosfato 1, del inglés <i>Sphingosine-1-phosphate receptor 1</i>
FcϵRI – Receptor de alta afinidad de IgE	STAT1 – Transductor de señal y activador transcripcional 1, del inglés <i>Signal Transducer And Activator Of Transcription 1</i>
IFNγ – Interferón γ	TGFβ - Factor de crecimiento transformante β , del inglés <i>Transforming growth factor-beta</i>
IL - Interleucina	TLR4 – <i>Toll-like receptor 4</i>
ILC2 – Células linfoides innatas de tipo 2, del inglés <i>Type 2 innate lymphoid cells</i>	Tregs – T reguladores
ILVs – Vesículas intraluminales, del inglés <i>Intraluminal vesicles</i>	VEs – Vesículas extracelulares
JAK2 – Janus quinasa 2	VSMCs – Células del músculo liso vascular, del inglés <i>Vascular smooth muscle cells</i>
LTB/C/D4 – Leucotrieno B/C/D 4	WT – Fenotipo salvaje, del inglés <i>Wild type</i>
mRNAs – RNAs mensajeros	ZO-1 - <i>Zonula occludens 1</i>
miRNA – microRNA	
MHC – Complejo mayor de histocompatibilidad, del inglés <i>Major histocompatibility complex</i>	
MPO - Mieloperoxidasa	
MVB – Cuerpo multivesicular, del inglés <i>Multivesicular body</i>	
MVs – Microvesículas	
NO – Óxido nítrico	

RESUMEN

La anafilaxia es una reacción de hipersensibilidad aguda, grave, multisistémica, que puede causar la muerte y en la que están implicados múltiples mediadores. Su incidencia está aumentando y los desencadenantes varían en función de la edad. Sin embargo, aunque existen tratamientos eficaces, esta es comúnmente infradiagnosticada debido a la escasez de biomarcadores y a la similitud con otras enfermedades, lo que complica el criterio clínico.

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas secuencias de RNA de aproximadamente 22 nucleótidos que inhiben múltiples RNA mensajeros (mRNAs), regulando así la síntesis proteica. Debido a ello, son importantes moduladores de procesos fisiológicos y patológicos, además de tener un gran potencial como biomarcadores. La función de los miRNAs en enfermedades alérgicas se ha estudiado ampliamente en la última década y se han llevado a cabo numerosas investigaciones donde se ha demostrado su participación en procesos como la degranulación de mastocitos o la síntesis de citoquinas proinflamatorias. A pesar de ello, los estudios en anafilaxia son prácticamente inexistentes.

Las vesículas extracelulares (VEs) son estructuras membranosas derivadas de las células. Existen diferentes clases en función de su origen y tamaño. Contienen múltiples tipos de biomoléculas y sirven como vehículo para la transferencia intercelular de estas, por lo que resultan cruciales en la comunicación intercelular y la regulación de condiciones fisiológicas y patológicas. Diversos estudios han demostrado la participación de las VEs en enfermedades alérgicas y, al igual que los miRNAs, han demostrado tener un gran potencial como biomarcadores.

En esta revisión bibliográfica se expone el conocimiento actual de los miRNAs, (principalmente del miRNA-155), y de las VEs en las enfermedades alérgicas, prestando especial atención a aquellos mecanismos que podrían estar implicados en la patogénesis de la anafilaxia. Además, discutiremos los hallazgos más recientes acerca de la posible aplicación de los miRNAs y VEs como biomarcadores diagnósticos en esta situación patológica.

ABSTRACT

Anaphylaxis is an acute, severe, multisystemic hypersensitivity reaction, which can be fatal and in which multiple mediators are involved. Its incidence is increasing and triggers vary depending on age. However, although there are effective treatments, it is commonly underdiagnosed due to the scarcity of biomarkers and the similarity with other diseases, which complicates clinical criteria.

MicroRNAs (miRNAs) are small RNA sequences of approximately 22 nucleotides that inhibit multiple messenger RNAs (mRNAs), thus regulating protein synthesis. Due to this, they are important modulators of physiological and pathological processes, in addition to having great

potential as biomarkers. The role of miRNAs in allergic diseases has been studied extensively in the last decade and numerous investigations have been carried out where their participation in processes such as mast cell degranulation or the synthesis of pro-inflammatory cytokines has been demonstrated. Despite this, the results in anaphylaxis are practically non-existent.

Extracellular vesicles (VEs) are cell-derived membranous structures. There are different classes depending on their origin and size. They contain multiple types of biomolecules and serve as a vehicle for their intercellular transfer, which is why they are crucial in intercellular communication and the regulation of physiological and pathological conditions. Several studies have shown the participation of VEs in allergic diseases and, like miRNAs, they have shown great potential as biomarkers.

This bibliographic review presents the current knowledge of miRNAs, (mainly miRNA-155), and VEs in allergic diseases, paying special attention to those mechanisms that could be involved in the pathogenesis of anaphylaxis. In addition, we will discuss the most recent findings about the possible application of miRNAs and VEs as diagnostic biomarkers in this pathological situation.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Anafilaxia deriva de las palabras griegas ‘ana’ (contra) y ‘phylaxis’ (protección). Se trata de una reacción de hipersensibilidad grave, rápida y multisistémica que puede causar la muerte del paciente⁽¹⁾. Es el resultado de la liberación de mediadores moleculares, como la histamina, que afectan principalmente a los sistemas tegumentario, cardiovascular y nervioso, y a los aparatos respiratorio y digestivo. Los síntomas cutáneos como la urticaria son los más comunes, pero en ocasiones se produce el colapso cardiovascular y la obstrucción respiratoria, dando lugar al denominado “choque anafiláctico”, el cual puede causar la muerte del paciente si no es diagnosticado y tratado a tiempo⁽²⁾.

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNAs no codificantes que actúan como guía en la regulación postranscripcional de RNAs mensajeros (mRNAs). Tienen un papel importante en la proliferación celular, diferenciación y supervivencia, así como en procesos patológicos como el cáncer o enfermedades cardiovasculares. Su longitud media es de 22 nucleótidos (nt) y se producen a partir de transcritos nucleares en un proceso que termina en la formación de un complejo de silenciamiento el cual se une por apareamiento de bases a las regiones 3’UTR de los mRNAs. El reconocimiento de la diana está determinado por la secuencia semilla, formada por los 6 nt entre las posiciones 2-7 en la región 5’ del miRNA⁽³⁾. Al unirse a la diana se produce la degradación del mRNA o la inhibición de su traducción. Se estima que más del 60% de los genes humanos codificadores de proteínas tienen al menos un sitio de unión de miRNAs, lo que implica que prácticamente todos los procesos biológicos están regulados por ellos⁽⁴⁾.

Las vesículas extracelulares (VEs) son un grupo heterogéneo de estructuras membranosas derivadas de las células que participan en múltiples procesos fisiológicos y patológicos. Existen tres tipos principales que se clasifican en función de su origen y tamaño: microvesículas, cuerpos apoptóticos y exosomas. Tienen un papel muy importante en la comunicación intercelular, ya que actúan como vehículos para la transferencia de proteínas, lípidos y RNAs de diferentes tipos, tanto localmente como a nivel sistémico⁽⁵⁾. Participan en procesos como la coagulación sanguínea o la inflamación, pero también están implicados en patologías como el cáncer, favoreciendo la metástasis y angiogénesis⁽⁶⁾.

Además, tanto las VEs como los miRNAs han ganado un enorme interés por su uso como biomarcadores⁽⁷⁾ debido a diversas características como su fácil detección y aislamiento de fluidos corporales como la sangre u orina⁽⁸⁾. En esta revisión resumiremos los roles conocidos de los miRNAs y de las VEs en enfermedades alérgicas e hipotizaremos sobre el papel que algunos de ellos podrían tener en las bases moleculares de la anafilaxia. Además, discutiremos múltiples aspectos de la anafilaxia, como el diagnóstico y las complicaciones que este tiene, así como el posible uso de estas moléculas como nuevos biomarcadores que den lugar a una mejora del mismo.

CAPÍTULO 2: ANAFILAXIA

2.1 Epidemiología y etiología

La anafilaxia se trata de una reacción alérgica cuya incidencia y causas desencadenantes varían en función de factores como la edad, zona geográfica de procedencia, sexo o nivel socioeconómico⁽⁹⁾. En términos generales, la incidencia de la anafilaxia ha aumentado con el paso de los años. Hasta 2005, la anafilaxia afectaba a 10/100.000 persona/año, mientras que a partir de esa fecha el número de casos se ha incrementado, alcanzando valores de 111/100.000 personas/año⁽¹⁰⁾. Además, se ha estimado que entre un 0,05 y 2% de la población sufrirán al menos una anafilaxia a lo largo de su vida⁽¹¹⁾. Estos datos probablemente no se deben únicamente a un aumento en los casos, sino también a un mayor consenso en los criterios diagnósticos. Sin embargo, muchas veces continúa siendo infradiagnosticada⁽¹²⁾.

En lo que respecta a la edad, la anafilaxia es más frecuente en niños de 0-4 años, donde los desencadenantes más habituales son alimentos como la leche de vaca y los huevos. En adultos los principales causantes de las reacciones son los medicamentos, entre los que se encuentran los antiinflamatorios no esteroideos y los antibióticos⁽¹³⁾.

En un 5-20% de los casos no se detecta la posible causa de la reacción. Cuando esto ocurre, se la denomina como idiopática⁽¹⁴⁾. Las anafilaxias iniciadas por las causas mencionadas hasta ahora se deben a la exposición, reconocimiento y respuesta a un alérgeno. Sin embargo, existen otros tipos que ocurren por activación directa de células efectoras sin el reconocimiento de un antígeno externo. Entre estas, destacan sobre todo las inducidas por ejercicio, que tienen lugar de forma espontánea al realizar actividad física⁽¹⁵⁾ o la causada por cambios de temperatura⁽¹⁶⁾.

2.2 Fisiopatología y mediadores implicados en anafilaxia

Los principales eventos fisiopatológicos que se observan durante la anafilaxia, así como los mediadores moleculares implicados en estas reacciones están representados en la **Figura 1**. La afectación cutánea es la más frecuente y habitual, sin embargo, en ocasiones tiene lugar una broncoconstricción muy intensa que compromete la respiración, así como una fuerte vasoconstricción a nivel circulatorio central, vasodilatación periférica y aumento de la permeabilidad vascular, lo cual produce la extravasación masiva de fluido de los vasos sanguíneos (hasta un 35%), dando lugar a la formación de edema y a una gran bajada de la presión sanguínea por hipovolemia, que lleva al fallo cardíaco y genera el choque anafiláctico que pone en peligro la vida del paciente⁽¹⁷⁾.

En un pequeño número de casos pueden ocurrir reacciones bifásicas. Esto consiste en que horas después del inicio tiene lugar una recidiva tardía en la que los síntomas pueden ser igual de graves⁽¹⁸⁾.

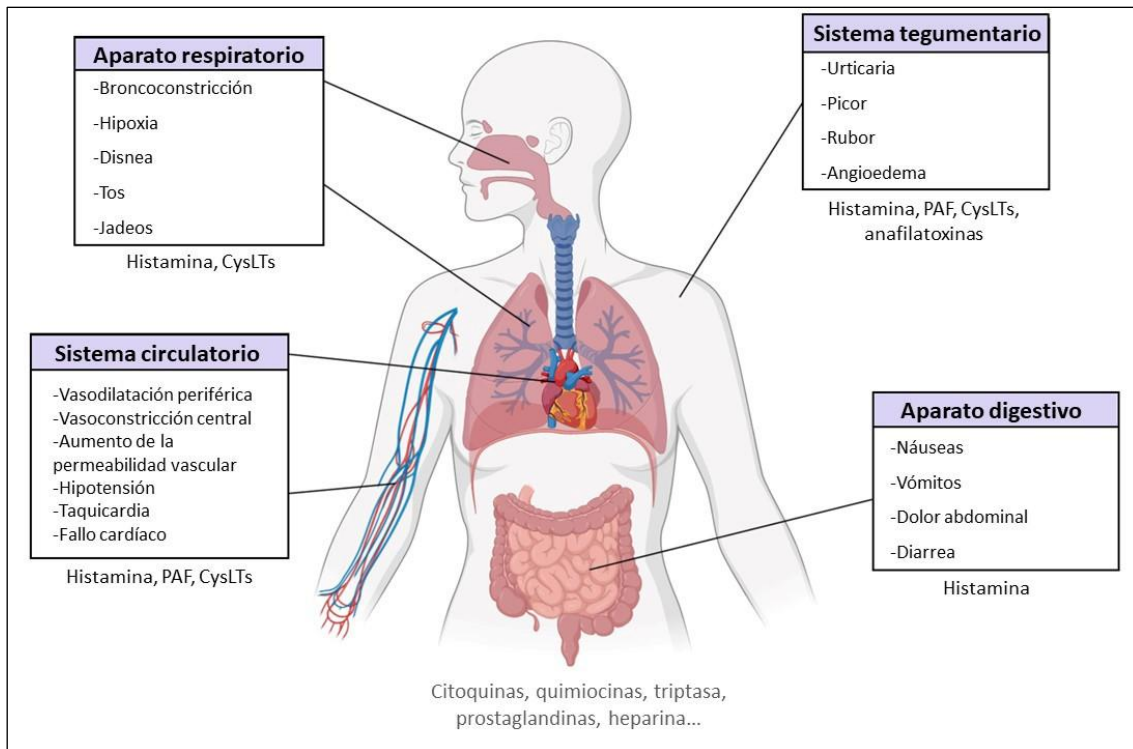


Figura 1. Cambios fisiopatológicos en anafilaxia y mediadores implicados. Basado en Reber LL, Hernandez JD, Galli SJ. The pathophysiology of Anaphylaxis, *J Allergy Clin Immunol*, 2017 Aug;140(2):335-348. Debajo de cada recuadro se encuentran los mediadores responsables, ya sea en humanos o en modelos de experimentación animal. En la parte inferior de la imagen se muestran otros mediadores descritos. Figura realizada con *Biorender*.

En anafilaxia podemos distinguir 3 niveles de acción celular y molecular: moléculas efectoras, células efectoras y mediadores químicos.

Moléculas efectoras:

-IgE: son anticuerpos con un papel central en anafilaxia y alergia en general. Las IgE se sintetizan de forma específica contra un determinado alérgeno y se unen a receptores de células efectoras en un proceso que se denomina sensibilización (**Figura 2**). Esto ocurre cuando un individuo se pone en contacto con un alérgeno al que nunca había estado expuesto antes. Este es detectado por las células presentadoras de antígenos (CPAs) del epitelio con el que ha entrado en contacto (vías respiratorias, sistema digestivo...) y migran al nódulo linfático más cercano o a la mucosa donde presentan epítopos del alérgeno procesado a los linfocitos T *naive*. En un ambiente con interleucina (IL) 4 y 13 (producidas por mastocitos, basófilos, eosinófilos...) se induce una respuesta Th2 y se produce el cambio de isotipo en los linfocitos B que posteriormente se transforman a células plasmáticas productoras de IgEs específicas contra el alérgeno. Estas IgE se unen a los receptores de alta afinidad FcεRI de mastocitos y basófilos⁽¹⁹⁾. Sin embargo, los niveles de IgE por sí solos no explican la susceptibilidad a anafilaxia ya que hay pacientes que con niveles indetectables de IgE específica circulante pueden presentar reacciones casi mortales, mientras que otros con valores altos contra un determinado alérgeno no muestran síntomas al exponerse a él⁽²⁰⁾. Esto nos indica que existen mecanismos de anafilaxia independientes de IgE o complementarios a dicho proceso.

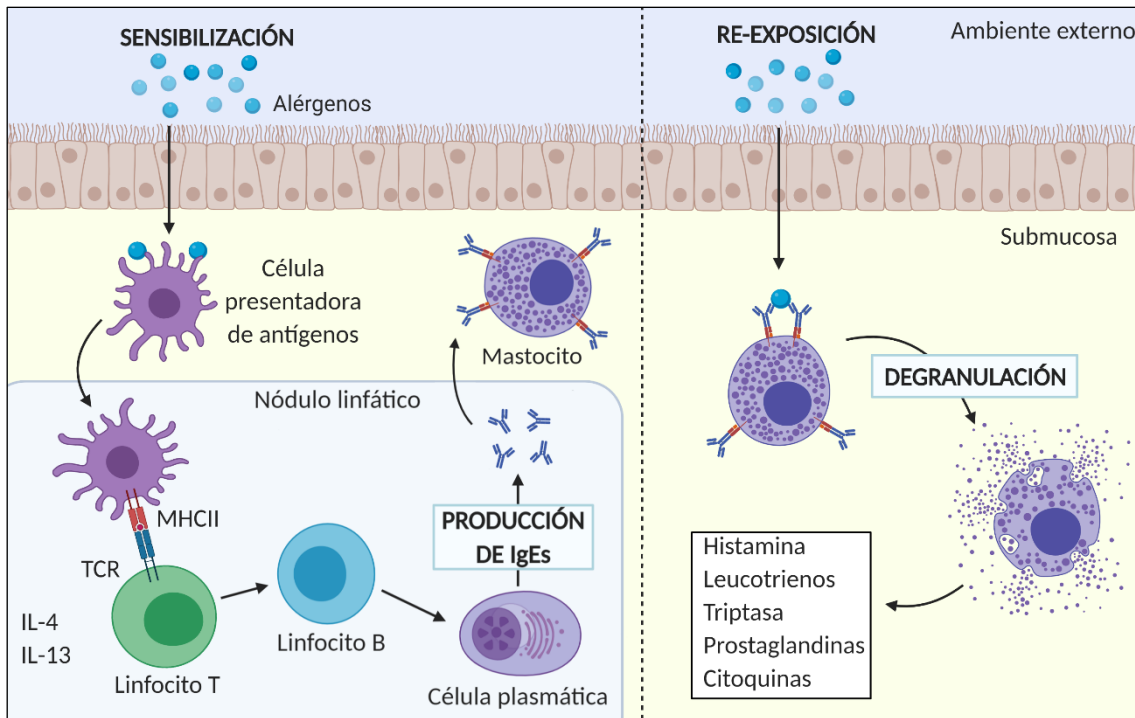


Figura 2. Mecanismo molecular de la alergia. En la sensibilización los alérgenos son captados por las células presentadoras de antígenos produciéndose una respuesta Th2 específica y producción de IgEs. Éstas se unen a los receptores de alta afinidad FcεRI de los mastocitos. En la fase de re-exposición al alérgeno, éste es detectado por dos o más IgEs y se produce el *cross-linking* y agregación de los FcεRI en los mastocitos, lo que induce su degranulación y la liberación de mediadores como la histamina o los leucotrienos. Figura realizada con *Biorender*.

-IgG: en ratones se ha observado que puede inducir anafilaxia sistémica pasiva (PSA)⁽²¹⁾. En humanos se ha descubierto recientemente que la IgG media la anafilaxia por fármacos inhibidores neuromusculares mediante un mecanismo en el que participan los neutrófilos y que puede actuar de forma independiente o agravando la anafilaxia mediada por IgE⁽²²⁾.

-Sistema del complemento: en concreto las anafilotoxinas C3a, C4a y C5a, que actúan como mediadores inflamatorios, pueden activar células mieloides como mastocitos y basófilos. Existe una correlación entre estas moléculas y la gravedad de la anafilaxia ⁽²³⁾.

Células efectoras:

-Mastocitos: junto a los basófilos son las células que expresan una mayor cantidad de FcεRI y por ello tienen un papel clave en las reacciones mediadas por anticuerpos IgE. Son células residentes de tejido. Tras la sensibilización, en la llamada fase de re-exposición, el alérgeno se detecta por dos o más IgEs unidas cada una a un receptor (lo que implica que el antígeno ha de ser como mínimo bivalente), produciéndose un *cross-linking* y la agregación de los FcεRI (**Figura 2**). Tras esto se activan cadenas de transducción de señales que terminan en la liberación de mediadores preformados como histamina, proteasas, leucotrienos y prostaglandinas⁽¹⁹⁾. También se producen cambios a nivel transcripcional para la síntesis de citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento, que se secretan horas después de la activación del mastocito, lo que causa en muchas ocasiones una segunda fase de inflamación⁽²⁴⁾.

-Basófilos: expresan gran cantidad de FcεRI y tienen gránulos preformados al igual que los mastocitos, pero se encuentran en el torrente sanguíneo. Producen IL-4 e IL-13, necesarias para que se originen las enfermedades alérgicas. Además, existen evidencias recientes de que los basófilos tienen actividad de CPA la cual, junto a las citoquinas secretadas, es necesaria para la respuesta Th2⁽²⁵⁾.

-Monocitos/macrófagos: presentan receptores de IgGs y responden a anafilotoxinas. Son especialmente importantes en las anafilaxias mediadas por IgG, donde generan una gran cantidad de factor de agregación plaquetario (PAF) y leucotrienos⁽²⁶⁾. Estudios en modelos de ratón de anafilaxia inducida por IgG demuestran que la inhibición de los macrófagos bloquea completamente la anafilaxia⁽²⁷⁾.

-Neutrófilos: presentan receptores de IgGs. Son fagocitos que contienen gránulos con moléculas señalizadoras y antimicrobianas⁽²⁸⁾. También pueden sintetizar mediadores lipídicos como leucotrienos o PAF propagando la inflamación. Entre las moléculas preformadas, destaca sobre todo la mieloperoxidasa (MPO), enzima encargada de la conversión de H₂O₂ en HOCl que favorece la muerte de patógenos fagocitados. Los niveles de MPO en sangre son mayores en pacientes con anafilaxia, aunque no está del todo claro su papel en la reacción⁽²⁹⁾. Además, en las anafilaxias ante inhibidores musculares mediadas por IgG secretan grandes cantidades de PAF y los niveles de MPO se correlaciona con la gravedad de la anafilaxia⁽²²⁾.

-Plaquetas: tienen receptores FcεRI, por lo que se pueden activar directamente por los alérgenos, pero lo más habitual es que lo hagan estimuladas por otras células. Están directamente implicadas en anafilaxias ocasionadas por radiocontraste y por transfusiones. Se activan en respuesta a PAF induciendo su adherencia, agregación y secreción de gránulos, lo que aumenta la permeabilidad vascular. Entre los mediadores secretados, está el factor plaquetario 4 (PF4) el cual está implicado en la liberación de histamina por basófilos y mastocitos, lo que constituye un importante *loop* de *feedback* positivo que aumenta y prolonga la reacción⁽³⁰⁾.

La activación celular tiene como consecuencia la liberación de gránulos con diversos mediadores químicos que son los que en última instancia provocan la fisiopatología de la anafilaxia (**Figura 1**). Estos destacan:

-Histamina: es el principal mediador descrito en las reacciones anafilácticas y se encuentra almacenado en los gránulos preformados de mastocitos y basófilos. Existen 4 tipos de receptores para esta molécula siendo en humanos los más relevantes H1 y H2. Los H1 provocan cambios en los niveles de calcio intracelular mientras que los H2 elevan los de AMP cíclico. La activación del receptor H1 se relaciona con broncoconstricción y taquicardia mientras que tanto el H1 como de H2 regulan la permeabilidad vascular periférica y la vasodilatación, A excepción de los mastocitos, todas las células expresan al menos uno de estos receptores⁽³¹⁾.

-PAF: es un fosfolípido producido por un gran número de células como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos e incluso células endoteliales durante la anafilaxia. Es

reconocido por su receptor PAFR, presente en múltiples tipos celulares, y tras su activación produce colapso circulatorio, disminución del gasto cardíaco, aumento en la permeabilidad y contracción del músculo liso de las vías respiratorias⁽³²⁾. Esto lo hace activando la secreción de histamina por parte de los mastocitos y de ácido araquidónico y prostaglandinas por parte de las células de músculo liso vascular (VSMCs)⁽³³⁾.

-Cisteinil leucotrienos (CysLTs): los principales son el leucotrieno B4 (LTB4), LTC4, LTD4 y son secretados por mastocitos y basófilos durante la anafilaxia. La consecuencia principal de su liberación es la broncoconstricción con un efecto 1000 veces mayor que la histamina⁽³⁴⁾.

2.3 Diagnóstico

El diagnóstico de la anafilaxia es fundamentalmente clínico y los criterios, de acuerdo al *National Institute of Allergy and Infectious Disease* y al *Food Allergy and Anaphylaxis Network*, se encuentran definidos en la **Tabla 1**⁽³⁵⁾. El principal problema en relación a este es la similitud que existe con otras enfermedades como el asma o la urticaria. Esto hace que a menudo la anafilaxia sea infradiagnosticada. Concretamente, en estudios de asma grave realizado en niños, se vio que el 17,8% cumplían suficientes criterios para ser clasificados como anafilaxia⁽³⁶⁾. Por otro lado, una encuesta realizada a casi 8000 personas de la comunidad médica sobre anafilaxia inducida por alimentos indicó que sólo la mitad de los encuestados identificó correctamente la anafilaxia al enfrentarse a un caso clínico sin afectación cutánea⁽³⁷⁾. Esto demuestra que la utilización de marcadores moleculares para complementar el diagnóstico resulta imprescindible.

El único biomarcador de anafilaxia actualmente utilizado es la medida de los niveles séricos de triptasa. La triptasa es la proteína mayoritaria que se libera en la degranulación de los mastocitos y existen inmunoensayos comerciales para su detección⁽³⁸⁾. El valor máximo de triptasa en sangre se alcanza entre 30 minutos y 2 horas tras el inicio de la reacción anafiláctica, lo cual permite obtener la muestra tiempo después de que ocurra. Se considera anafilaxia cuando el nivel de triptasa sérica del paciente durante el proceso patológico es significativamente mayor con respecto al valor basal (el cual se determina con una muestra de suero obtenida días después de la anafilaxia). Sin embargo, en algunas anafilaxias inducidas por alimentos, el aumento de los niveles de triptasa es inexistente, por lo que se trata de un biomarcador poco fiable⁽³⁹⁾. La histamina se ha postulado también como biomarcador, pero no se utiliza debido a su inestabilidad, rápida degradación y peor correlación en comparación con la triptasa⁽⁴⁰⁾.

En definitiva, actualmente carecemos de un biomarcador robusto que nos permita diagnosticar la anafilaxia de forma inequívoca. El único disponible, la triptasa sérica, queda lejos de ser óptimo debido a la heterogeneidad de sus niveles en cada individuo y a no elevarse en todos los casos. Por este motivo es necesario determinar nuevos marcadores moleculares que permitan un mejor reconocimiento de los pacientes para poder tratarlos y con ello reducir las muertes y aumentar su calidad de vida. Entre ellos, destacan como posibles candidatos los miRNAs y las

VEs debido al potencial que están comenzando a mostrar en el diagnóstico de otras enfermedades⁽⁷⁾.

Tabla 1. Criterios clínicos para el diagnóstico de la anafilaxia

La anafilaxia es altamente probable cuando se cumple alguno de estos tres criterios:

1. Inicio agudo de la enfermedad con afectación cutánea y/o de mucosa y al menos una de las siguientes características:
 - a. Afectación respiratoria (disnea, broncoespasmo, estridor, hipoxia)
 - b. Afectación cardiovascular (hipotensión, colapso)
2. Dos o más de las siguientes características ocurren rápidamente tras la exposición a un alérgeno probable para ese paciente:
 - a. Afectación de la piel o mucosa (urticaria generalizada, picor, enrojecimiento)
 - b. Afectación respiratoria
 - c. Afectación cardiovascular
 - d. Síntomas gastrointestinales persistentes (dolor abdominal, vómitos)
3. Hipotensión tras la exposición a un alérgeno conocido.
 - a. En niños: tensión arterial sistólica baja en relación a su edad o disminución del 30% o más de su tensión arterial sistólica*.
 - b. En adultos: tensión arterial sistólica < 90 mm Hg o reducción del 30% o más respecto al basal

* La tensión arterial sistólica baja en niños se define como menos de 70 mm Hg desde 1 mes a 1 año, menos de (70 mm Hg + [2 x edad]) de 1 a 10 años, y menos de 90 de 11 a 17 años.

2.4 Tratamiento

La adrenalina o epinefrina es el tratamiento aconsejado por las guías de manejo clínico, siendo indicada como la primera medicación a la que recurrir y se recomienda su administración inmediata tras el reconocimiento de los síntomas⁽⁴¹⁾. Se administra vía intramuscular mediante autoinyectores y tiene un muy buen perfil de seguridad⁽⁴²⁾. Esta actúa sobre los distintos receptores adrenérgicos causando diferentes efectos: sobre los α_1 causa vasoconstricción periférica, lo que reduce el edema, revierte la hipotensión y el posible shock; sobre los β_1 aumenta la fuerza y la frecuencia cardíaca reduciendo también la hipotensión; y sobre los β_2 revierte la broncoconstricción y disminuye la liberación de mediadores inflamatorios⁽⁴³⁾. Los pacientes que toman fármacos beta-bloqueantes no responden al tratamiento con adrenalina. En este caso el tratamiento utilizado es el glucagón⁽⁴⁴⁾.

Al tratarse de una situación patológica aguda y concreta, para la realización de ensayos clínicos se requiere la inducción de la misma, lo que es un problema ético y práctico. Dada esta complejidad, los tratamientos que tenemos actualmente se basan en estudios observacionales y en extrapolación directa de estudios de laboratorio⁽⁴⁵⁾.

Además, existen otras recomendaciones: eliminar de forma inmediata la causa de la anafilaxia si es posible, colocar al paciente en posturas determinadas en función de cuál es su cuadro clínico, aportar oxígeno mediante mascarilla, administrar fluido intravenoso para restaurar

el volumen circulatorio y que la adrenalina tenga un mayor efecto y usar agonistas de β_2 de acción rápida para favorecer el efecto broncodilatador⁽¹³⁾.

Existen además tratamientos complementarios de segunda/tercera línea, los cuales nunca se usan como tratamiento inicial ni único. Entre estos se encuentran los antihistamínicos y los glucocorticoesteroides. El uso de antihistamínicos H1 orales es eficaz para paliar los síntomas cutáneos que se originan durante la anafilaxia⁽⁴⁶⁾. En el caso de los glucocorticoesteroides, no tienen ningún efecto sobre los síntomas iniciales, sino que su función es prevenir los de larga duración, especialmente en aquellos pacientes que sufren también de asma. Además, ayudan a evitar las reacciones bifásicas⁽⁴⁷⁾.

CAPÍTULO 3: microRNAs

3.1 Formación y acción de los microRNAs

Los miRNAs regulan a nivel postranscripcional la expresión de la mayoría de los genes del organismo. Esto lo hacen reconociendo a sus mRNAs diana por complementariedad de bases entre su secuencia semilla y la región 3'UTR de los mRNAs y guiando así a un complejo de silenciamiento que degrada al mRNA o inhibe su traducción. De esta forma participan en múltiples procesos fisiológicos y patológicos⁽⁴⁾.

Los miRNAs se encuentran codificados en intrones de genes y su formación comienza por la transcripción llevada a cabo por la RNA polimerasa II (**Figura 3**). En primer lugar, se forma un transcrito largo llamado pri-miRNA (más de 1000 nt) con una región apareada, un *loop* y los dos extremos con la caperuza y la cola de poliA desapareados. Este transcrito se procesa en el propio núcleo mediante la RNasa III Drosha y el cofactor DGCR8, que forman un complejo llamado microprocesador. El microprocesador corta el pri-miRNA eliminando las cadenas desapareadas de los extremos y parte de la hebra apareada. Tras la catálisis se obtiene un pre-miRNA formado por el *loop* y una región apareada de aproximadamente 22 nt y que tiene un extremo 3' protuberante. El pre-miRNA se exporta al citoplasma mediante la exportina 5 y RAN-GTP. En el citoplasma, Dicer corta cerca del *loop* terminal liberando un dúplex de RNA, y una de sus hebras se carga en proteínas argonauta (AGO) formando un complejo efector llamado *RNA-induced silencing complex* (RISC). En algunos miRNAs se cargan ambas hebras con la misma frecuencia y en otros casos hay una que es más habitual y además más potente y activa en el silenciamiento⁽⁴⁸⁾. El miRNA actúa como guía para que el complejo RISC reconozca y regule determinados mRNAs. El mecanismo de represión depende del grado de complementariedad entre el miRNA y el mRNA. Cuando no hay complementariedad total, se produce la inhibición de la traducción. Cuando la complementariedad es total, AGO tiene la capacidad de catalizar la degradación del mRNA, y se pueden producir en este caso ambos mecanismos⁽⁴⁹⁾.

Para estudiar la función celular de un determinado miRNA se usan los miRNA *mimics* y los *antimiRs* o miRNA *inhibitors*. Los *mimics* son dúplex de RNA sintéticos que al introducirse en las células se comportan de forma equivalente a miRNAs endógenos, lo que permite simular una sobreexpresión. Los *inhibitors* son moléculas de RNA sintéticas complementarias a miRNAs endógenos, de tal manera que los secuestra e impide que realice su función, simulando una reducción en la expresión.

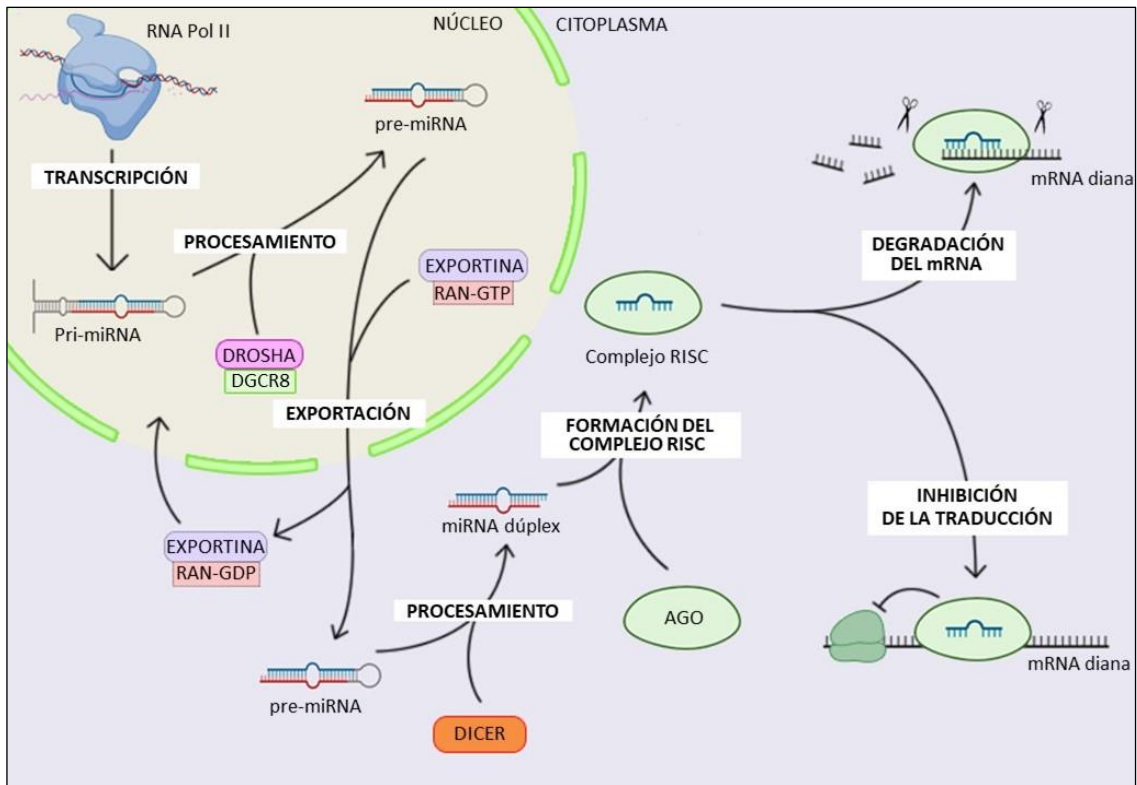


Figura 3. Biogénesis de miRNAs y mecanismo de acción. La RNA Polimerasa II transcribe el gen codificante para el miRNA formando un pri-miRNA. Éste es procesado en el núcleo por Drosha y DGCR8 dando lugar a un pre-miRNA que es exportado al citoplasma mediante un mecanismo exportina 5-RAN-GTP dependiente. En el citoplasma, Dicer procesa al pre-miRNA y genera un dúplex. Este dúplex interactúa con la proteína AGO y una de las hebras se cargará en ella dando lugar al complejo de silenciamiento RISC. Este complejo es guiado por el miRNA e interactúa con su mRNA diana. Si la complementariedad entre el miRNA y mRNA es total, el complejo RISC puede degradar al mRNA. Cuando no es total, tiene lugar la inhibición de la traducción. Figura realizada con *Biorender*

3.2 miRNAs: Bases moleculares en enfermedades alérgicas

El conocimiento sobre el papel de los miRNAs en enfermedades alérgicas ha aumentado durante los últimos años⁽⁵¹⁾, sin embargo, tan solo existe una publicación en la actualidad que relacione directamente algún miRNA con la anafilaxia⁽⁵²⁾. Los tres mecanismos descritos mediante los cuales los miRNAs contribuyen a las enfermedades alérgicas son: alterando el balance Th1/Th2, afectando al desarrollo y a las funciones de las células del sistema inmune y promoviendo la inflamación crónica del epitelio y el remodelamiento tisular⁽⁵¹⁾. Por tanto, discutiremos el papel que desempeñan algunos de los miRNAs implicados en las enfermedades alérgicas y se discutirá su posible participación en la anafilaxia, centrándonos sobre todo en el miRNA-155. La **Tabla 2** muestra un listado detallado de distintos miRNAs, sus dianas, funciones y enfermedades alérgicas en las que han sido descritos.

El miRNA-21 es uno de los primeros miRNAs estudiados en el campo de la alergia. Su diana principal es la IL-12p35, una citoquina derivada de macrófagos y células dendríticas (CDs) implicada en la polarización de la respuesta inmune hacia Th1. Además, se encuentra elevado en un modelo de ratón asmático transgénico para la IL-13. Esto hace que sea un importante regulador de la respuesta inmune y sus niveles altos favorezcan la respuesta Th2 de las enfermedades alérgicas⁽⁵³⁾. A su vez, es el miRNA cuyos niveles aparecen más aumentados en pacientes con

esofagitis eosinofílica (EoE) junto con el miRNA-223, lo cual se revierte tras el tratamiento de la enfermedad. Conjuntamente se correlacionan con el nivel de eosinofilia y polarización de la respuesta inmune. El miRNA-223 además se asocia con niveles bajos de linfocitos T reguladores (Tregs), necesarios para la tolerancia inmune⁽⁵⁴⁾. También se ha detectado que el miRNA-21 se encuentra elevado en el suero de pacientes de asma y EoE, por lo que se sugiere su potencial uso como biomarcador novedoso y no invasivo de enfermedades inflamatorias alérgicas⁽⁵⁵⁾.

Tabla 2. Funciones de los miRNAs en enfermedades alérgicas

miRNA	Enfermedad	Funciones/mecanismo de acción	Diana
Let-7	Asma	Rol antiinflamatorio en asma ⁽⁶²⁾	IL-13
miRNA-21	Asma, EoE	Polarización de la respuesta inmune a Th2 ⁽⁵³⁾ Correlacionado con eosinofilia en asma y EoE ^(53, 54)	IL-12p35
miRNA-126	Asma, Dermatitis contacto	Polarización de la respuesta inmune a Th2 ⁽⁵⁶⁾ Correlacionado con IL-4, linfocitos Th17 y severidad en asma ⁽⁵⁷⁾ Aumenta y acelera la degranulación de mastocitos ⁽⁵⁸⁾	OBF1? PI3k/Akt?
miRNA-133a	Asma	Su disminución causa hiperreactividad y contracción de vías aéreas ⁽⁶⁵⁾	RhoA
miRNA-146a	Asma, EoE	Suprime la respuesta Th1 ⁽⁶³⁾ . Aumentado en asma ⁽⁶⁴⁾ y EoE ⁽⁵⁴⁾	STAT1
miRNA-155	Asma, PSA, Dermatitis atópica, Aterosclerosis*	Promueve la respuesta Th2. Correlacionado con IL-4, IL-5, IL-13 ⁽⁶⁶⁾ Necesario para la migración de linfocitos Th2 al pulmón ⁽⁶⁷⁾ Regulador negativo de la desgranulación de mastocitos. Su delección aumenta la severidad de PSA ⁽⁵²⁾ Favorece la proliferación de linfocitos T y contribuye a la inflamación ⁽⁷⁰⁾ Reduce la expresión de las proteínas de las uniones adherentes de la epidermis ⁽⁷⁰⁾ y del endotelio ⁽⁷¹⁾ Reduce la expresión de eNOS y la producción de NO en VSMCs ⁽⁷³⁾	PU.1 S1pr1 PI3ky CTLA4 PKI α eNOS
miRNA-221	Asma	Aumenta la expresión de IL-4 en mastocitos ⁽⁵⁹⁾ Aumenta y acelera la desgranulación de mastocitos ⁽⁶⁰⁾	PTEN PI3k/Akt?
miRNA-223	EoE	Elevado en EoE, correlacionado negativamente con Tregs ⁽⁵⁴⁾	?
miRNA-375	EoE, Rinitis alérgica	Niveles reducidos en rinitis alérgica. Los agonistas reducen la inflamación alérgica ⁽⁶¹⁾ . Reducido en EoE ⁽⁵⁴⁾	JAK2

Akt, Proteína quinasa B; *eNOS*, Óxido nítrico sintasa endotelial; *EoE*, Esofagitis eosinofílica; *JAK2*, Janus quinasa 2; *NO*, Óxido nítrico; *OBF1*, *Oct binding factor* 1; *PI3k*, Fosfatidilinositol-3-quinasa; *PSA*, Anafilaxia sistémica pasiva; *PTEN*, Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa; *s1pr1*, Receptor de la esfingosina 1-fosfato 1; *STAT1*, Transductor de señal y activador transcripcional 1; *VSMCs*, Células del músculo liso vascular.

* No es una enfermedad alérgica pero el mecanismo del miR-155 en ella es de interés para la anafilaxia

En un modelo de ratón asmático por polvo se ha visto un aumento en los niveles del miRNA-126 tras la exposición al mismo. La inhibición de este miRNA provoca la disminución de los niveles de IL-4, IL-5 e IL-13, asociados a la sintomatología de la inflamación alérgica. Aunque su diana no está confirmada, un aumento de este reduce los niveles de *Oct binding factor 1* (OBF1), un factor de transcripción que regula negativamente a *toll-like receptor 4* (TLR4) y el factor de transcripción máster de la respuesta Th2 GATA3. Por lo tanto, el miRNA-126 es un activador específico de la inflamación alérgica⁽⁵⁶⁾. En niños con asma agudo se ha visto que sus niveles en sangre periférica se encuentran aumentados y correlacionan positivamente con la IL-4, linfocitos Th17 y con la severidad del asma, y negativamente con interferón γ (IFN γ). Todo esto sugiere que este miRNA tiene un papel importante en la desregulación del sistema inmune en asma, postulándose, además, como biomarcador serológico para la predicción de la severidad de esta enfermedad⁽⁵⁷⁾. En otro modelo experimental de ratón con dermatitis alérgica de contacto, se observó un aumento del miRNA-126 en mastocitos, lo que daba lugar a un aumento de la liberación de histamina y hexosaminidasa promoviendo la movilización de Ca²⁺ intracelular mediante la vía fosfatidilinositol-3-kinasa/proteína kinasa B (PI3k/Akt), asociada al *cross-linking* de IgEs. Por tanto, este miRNA favorece y acelera la degranulación de mastocitos⁽⁵⁸⁾. Este mecanismo de acción resulta interesante ya que la degranulación rápida de los mastocitos es crucial en la anafilaxia, y sugiere un posible papel del miR-126 en su fisiopatología.

El miRNA-221, que ha sido sugerido como posible biomarcador en cáncer, se encuentra aumentado en un modelo de asma murino, así como en los pulmones y en el suero de niños asmáticos. Además, en mastocitos de ratón se ha observado que la sobreexpresión del miRNA-221 eleva los niveles de IL-4 al ser su diana la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), una enzima que regula negativamente una vía de señalización que estimula la secreción de esta citocina⁽⁵⁹⁾. Este miRNA se ha relacionado ampliamente con diversas funciones de los mastocitos como el control del ciclo celular, el citoesqueleto o la adherencia celular y, recientemente, se ha observado que sus niveles aumentan en mastocitos activados favoreciendo su desgranulación y que actúa, al igual que el miRNA-126, sobre la vía PI3k/Akt⁽⁶⁰⁾. Por tanto, este miRNA también resulta un candidato de interés en anafilaxia por favorecer la degranulación de los mastocitos.

El miRNA-375 está regulado negativamente por la IL-13 y sus niveles se encuentran disminuidos en el epitelio nasal de ratones en un modelo de rinitis alérgica⁽⁶¹⁾. Además, es el miRNA que se encuentra más reducido en EoE⁽⁵⁴⁾. El uso de agonistas del miRNA-375 disminuye la inflamación de la mucosa nasal en la rinitis y aumenta la expresión de citoquinas antiinflamatorias al reducir los niveles de su diana Janus quinasa 2 (JAK2), cuya vía de señalización está implicada en inflamación⁽⁶¹⁾.

La familia de miRNAs Let-7 es un conjunto de miRNAs muy conservados que tienen como diana la IL-13. En modelos murinos de asma se ha visto la reducción de los niveles de esta familia durante la inflamación alérgica. La administración intranasal de un *Let-7 mimic* reduce de forma significativa los niveles de IL-13 y la sintomatología del asma, por lo que queda claro su papel antiinflamatorio⁽⁶²⁾.

El miRNA-146a tiene como diana al transductor de señal y activador transcripcional 1 (STAT1) y suprime así de forma selectiva la respuesta Th1 y favorece la polarización a Th2⁽⁶³⁾. Esto concuerda con el hecho de que sus niveles estén aumentados en asma⁽⁶⁴⁾ y en pacientes con EoE⁽⁵⁴⁾. Además, en el caso de la EoE no sólo aparece aumentado en el tejido, sino también en el plasma, lo cual sugiere su uso como posible biomarcador no invasivo.

En otro modelo murino de asma se ha observado una disminución de los niveles del miRNA-133a, lo que da lugar a un aumento de la GTPasa RhoA que causa hiperreactividad y contracción de las vías aéreas. Esta reducción de sus niveles parece que se origina por un aumento de la IL-13⁽⁶⁵⁾.

El miRNA-155 se consideró inicialmente supresor de la respuesta Th2, hasta que el aumento de sus niveles se relacionó con el asma alérgica⁽⁶⁶⁾. En un modelo murino sensibilizado a ovoalbúmina (OVA) se observaron niveles aumentados de este miRNA tras la exposición al alérgeno. El uso de ratones con este miRNA delecionado (ratón *miRNA-155*^{-/-}) permitió observar una patente reducción del número de eosinófilos en el pulmón tras la exposición al alérgeno y también en la sangre. Además, se reducían los niveles de IL-4, IL-5 e IL-13 secretados por los nódulos linfáticos peribronquiales. Por tanto, parece que el miRNA-155 tiene un papel importante en la regulación de la inflamación eosinofílica de las vías aéreas inducida por un mecanismo Th2 tras la exposición al alérgeno. Además, el ratón *miRNA-155*^{-/-} mostraba niveles elevados del factor de transcripción PU.1, diana del miRNA-155 y regulador negativo de Th2⁽⁶⁶⁾. Datos semejantes fueron hallados mediante el empleo de un modelo murino alérgico al polvo. En este modelo, los ratones *miRNA-155*^{-/-} presentaban susceptibilidad a infecciones por helmintos atribuida a su incapacidad de generar una respuesta Th2. Ensayos *in vitro* realizados en paralelo, demostraron que la activación de los linfocitos Th2 aumentan los niveles del miRNA-155 y a consecuencia de esto se reducían los del receptor de la esfingosina 1-fosfato 1 (s1pr1), mientras que en el *miRNA-155*^{-/-} no se producían cambios en estos linfocitos. Además, se demostró que esta regulación del miRNA sobre s1pr1 es imprescindible para que se genere la inflamación mediada por células Th2, puesto que la reducción inicial de los niveles de s1pr1 tras la activación de los Th2 es necesaria para su migración desde los nódulos linfáticos a los pulmones⁽⁶⁷⁾. Si bien estos resultados demostraban el papel del miRNA-155 en las reacciones de inflamación aguda tras la exposición al alérgeno, también se ha sugerido que es relevante en la inflamación crónica de las vías aéreas⁽⁶⁸⁾. Este miRNA participa en la regulación de la inflamación alérgica mediada por IL-33 (citoquina secretada por el epitelio) y células linfoides innatas de tipo 2 (ILC2). Estas células se activan por

la IL-33 y dan lugar a una respuesta Th2. Parece que el miRNA-155 participa tanto en la producción de la IL-33 en el epitelio, en la respuesta y activación de las ILC2 ante ella y en el mantenimiento de la inflamación crónica alérgica⁽⁶⁸⁾. Posteriormente se detectó una reducción del miRNA-155 en los esputos de pacientes asmáticos, lo cual se correlaciona con los niveles del miRNA en las vías aéreas, y un aumento del miRNA-155 en células mononucleares de sangre periféricas tras su activación. Los cambios de expresión de este miRNA en los modelos de inflamación crónica fueron menores en comparación con la inducción de la inflamación aguda, ante lo cual parece que el miRNA-155 presenta un papel predominante en la inflamación alérgica aguda y no tanto en la crónica⁽⁶⁹⁾.

En lo que respecta a la anafilaxia, se ha demostrado que el miRNA-155 controla la degranulación de los mastocitos. Además, se ha relacionado con modelos murinos de PSA donde ratones *miRNA-155*^{-/-} mostraron una sintomatología mucho más grave que los de fenotipo salvaje (WT). Ensayos complementarios *in vitro* demostraron que el miRNA-155 actúa como un regulador negativo de la degranulación mastocitaria través de un mecanismo que implica a la PI3ky, al contrario que el miRNA-126 y el miRNA-221⁽⁵²⁾.

Por otra parte, lesiones cutáneas de pacientes con dermatitis atópicas (DA) presentan niveles elevados del miRNA-155, secretado por los linfocitos T infiltrados en ellas. La activación *in vitro* de los linfocitos Th1 y Th2 da lugar a un incremento de este miRNA debido a que la diana sobre la que actúa es *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* (CTLA4), un regulador negativo de la función de las células T cuyo bloqueo produce un aumento de las enfermedades alérgicas e inflamatorias. Esto indica que el miRNA-155 podría participar en la regulación los linfocitos T suprimiendo a CTLA4 y contribuyendo así a la inflamación de la piel⁽⁷⁰⁾. Mediante el empleo de un modelo experimental en ratón de DA, se demostró que el miRNA-155 participa en la inflamación y descubrieron que la *Protein Kinase Inhibitor α* (PKI α) es una de sus dianas. La regulación negativa del miRNA-155 sobre PKI α da lugar a la reducción de los niveles de proteínas de las uniones adherentes de la epidermis como claudina-1, *zonula-occludens-1* (ZO-1) y ocludina⁽⁷¹⁾. Esto concuerda con lo observado en aterosclerosis acerca del miRNA-155 secretado a la sangre por las VSMCs, donde participa en la ruptura de la barrera endotelial al reducir los niveles de proteínas de las uniones adherentes del endotelio como ZO-1, catenina endotelial y β -catenina⁽⁷²⁾. La diana a través del cual se ejercía esta regulación no fue encontrada, por lo que es posible que sea también a través de PKI α como se observó en DA. Este mecanismo de acción es de interés puesto que el miRNA-155 podría estar implicado en la disrupción de la barrera endotelial durante la anafilaxia y el consiguiente aumento de la permeabilidad vascular. Se ha observado también que la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) es una diana del miRNA-155 en VSMCs y que el incremento de sus niveles reduce la expresión de la enzima y por tanto disminuye la síntesis del óxido nítrico (NO) intracelular, favoreciendo la contracción de las VSMCs y su proliferación en aterosclerosis⁽⁷³⁾. El NO es un inductor de la vasodilatación

vascular, por lo que al estar su síntesis regulada por el miRNA-155 en VSMCs, es posible que tenga un papel importante regulando la vasodilatación periférica durante la anafilaxia.

3.3 miRNAs: Biomarcadores de enfermedades alérgicas

Los miRNAs han generado un interés como biomarcadores en el campo del diagnóstico molecular debido a su papel en la regulación celular y los cambios en sus niveles en procesos patológicos. Una de las características que los postula como unos marcadores prometedores es que son estables en la sangre y se pueden detectar en muchos fluidos corporales, lo que permite la obtención no invasiva de muestras⁽⁸⁾. Además, su cuantificación por qPCR es relativamente asequible y reproducible⁽⁶⁴⁾. Las investigaciones en este aspecto se centran en desarrollar modelos basados en un grupo de varios miRNAs (perfil de expresión o *fingerprint*) que se relacionen con la presencia de la enfermedad, severidad y en algunos casos la caracterización de distintos endotipos. Esto tiene cierta ventaja frente a usar un único miRNA como biomarcador. Por ejemplo, el miRNA-21 se ha propuesto como biomarcador del asma y EoE⁽⁵⁵⁾, no obstante, se caracteriza también por ser uno de los principales miRNAs cuya expresión se ve aumentada en cáncer favoreciendo su desarrollo, además de participar en muchos otros procesos⁽⁷⁴⁾. Por lo tanto, el uso de un único miRNA puede dar lugar a inespecificidades.

En un estudio en asma y rinitis alérgica llevado a cabo por Panganiban *et al.* en 2016 se evaluaron más de 40 miRNAs en plasma de pacientes con asma, rinitis alérgica o individuos sanos. Se emplearon los 6 que consideraron más relevantes tras su análisis (miRNA-125b, miRNA-16, miRNA-299-5p, miRNA-126, miRNA-206, y miRNA-133b) y se diseñó un algoritmo con el cual poder diferenciar entre los distintos pacientes en un 92,4% de los casos, con un valor predictivo positivo y un valor predictivo negativo muy altos, lo que supone un modelo ideal con excelente potencial diagnóstico⁽⁶⁴⁾.

En otro estudio de Jia *et al.* de 2018, se analizó la expresión de miRNAs en la mucosa nasal de pacientes con rinitis alérgica y se determinó que la utilización conjunta de tres de ellos (miRNA-126-5p, miRNA-19a-5p y miRNA-26a-5p) diagnostica la enfermedad con un 89,6% de sensibilidad y 70% de especificidad, además de correlacionarse con la gravedad de la enfermedad⁽⁷⁵⁾. Otro estudio similar de He *et al.* de 2017 con mayor número de población muestral concluyó que la combinación del miRNA-221 y el miRNA-142-3p podía servir como biomarcador de la enfermedad con un 81,2% de sensibilidad y 64,9% de especificidad⁽⁷⁶⁾. Por otra parte, se ha explorado el uso de los miRNAs como marcadores predictivos de la remisión del asma. Un modelo generado tras el análisis del suero de niños permite predecir esta con 84% de sensibilidad y 70% de especificidad⁽⁷⁷⁾.

Además, los miRNAs se han utilizado para determinar la eficacia de la inmunoterapia. El mayor problema de esta es que la única forma de evaluar si está teniendo efecto es mediante una re-exposición del paciente al alérgeno, lo cual es potencialmente peligroso. Un estudio de

Specjalski *et al.* de 2016 sobre la inmunoterapia contra el veneno de avispa demostró aumentos en la expresión del miRNA-143, Let-7d, y disminución en los miRNA-146b, miRNA-106 y miRNA-485, lo que sugiere un posible uso de dichos miRNAs para su monitorización⁽⁷⁸⁾.

CAPÍTULO 4: VESÍCULAS EXTRACELULARES

4.1 Formación y acción de las vesículas extracelulares

Las VEs son relevantes en múltiples procesos fisiológicos y patológicos debido a su participación en la comunicación intracelular, actuando como vehículos de lípidos, miRNAs, proteínas, mRNAs, metabolitos, etc. Pueden ejercer su función moduladora de forma autocrina sobre la propia célula secretora y de forma paracrina sobre células cercanas o a nivel sistémico. Existen tres tipos de VEs que se diferencian en función de su origen y tamaño: microvesículas, exosomas y cuerpos apoptóticos⁽⁵⁾.

Las microvesículas (MVs) son estructuras membranosas que se forman directamente por gemación y fisión de la membrana plasmática de las células (**Figura 4**). Su tamaño varía normalmente entre 50 y 1000 nm, pero pueden ser mayores. Su formación requiere de grandes cambios a nivel de composición de membrana y de la concentración intracelular de Ca^{2+} que permitan modular su curvatura y rigidez⁽⁷⁹⁾. Las proteínas secretadas en las MVs se cargan mediante unión a lípidos de anclaje de la membrana plasmática interna, que da lugar a la formación de pequeños dominios de membrana a partir de los cuales se forma la MV como tal. En cuanto a los ácidos nucleicos, no están claro los mecanismos moleculares por los cuales éstos son dirigidos a la membrana plasmática para secretarse en MVs⁽⁸⁰⁾. Por otra parte, los cuerpos apoptóticos se forman de manera similar, pero no son secretados por células sanas, sino que son restos celulares que se forman en la etapa tardía de la apoptosis y que están constituidos por fragmentos nucleares y citoplasmáticos⁽⁸¹⁾.

Los exosomas son vesículas membranosas de entre 30 y 150 nm generadas a partir de la vía endosomal. La biogénesis comienza con la formación y maduración de endosomas tempranos, proceso durante el cual su membrana se invagina generando vesículas intraluminales en el interior (ILVs), dando lugar al cuerpo multivesicular (MVB) (**Figura 4**)⁽⁸²⁾. Las ILVs posteriormente serán los exosomas. Durante este proceso es importante el *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT), que participa en la formación de las ILVs, en la elección de los productos que llevan en su interior y en la posterior secreción. Durante su formación, las ILVs se ven enriquecidas en diferentes tipos de proteínas como ALIX, sintenina o sindecanos, las cuales participan en su biogénesis⁽⁸³⁾, y también en proteínas de membrana como la tetraspanina CD63. Estas proteínas son de gran utilidad puesto que se usan a nivel experimental para detectar y caracterizar los exosomas⁽⁸⁴⁾. Una vez se han formado los MVBs, estos pueden degradarse en lisosomas o dirigirse a la membrana para liberar los exosomas, los cuales se secretan tras la fusión de los MVBs con la membrana plasmática con la participación de proteínas como SNAREs, Rabs y Ras GTPasas⁽⁸⁵⁾.

Una vez en el espacio extracelular, las VEs pueden desplazarse hasta otras células y causar efectos que promuevan cambios fenotípicos afectando al estado fisiológico o patológico.

Pueden desencadenar señalización intracelular por unirse a receptores de superficie, o pueden internalizarse y liberar su contenido en el interior celular. La internalización es necesaria, por ejemplo, para que los ácidos nucleicos presentes en las VEs puedan regular la expresión génica de las células diana⁽⁸⁶⁾. Los procesos fisiológicos en los que están implicadas las VEs son, entre otros, coagulación sanguínea, inflamación, proliferación de células madre, comunicación neuronal⁽⁸⁷⁾. En cuanto a procesos patológicos, un descubrimiento reciente propone que las VEs constituyen un mecanismo importante para la transferencia de proteínas priónicas o péptidos β -amiloides favoreciendo la propagación de enfermedades neurodegenerativas⁽⁸⁸⁾.

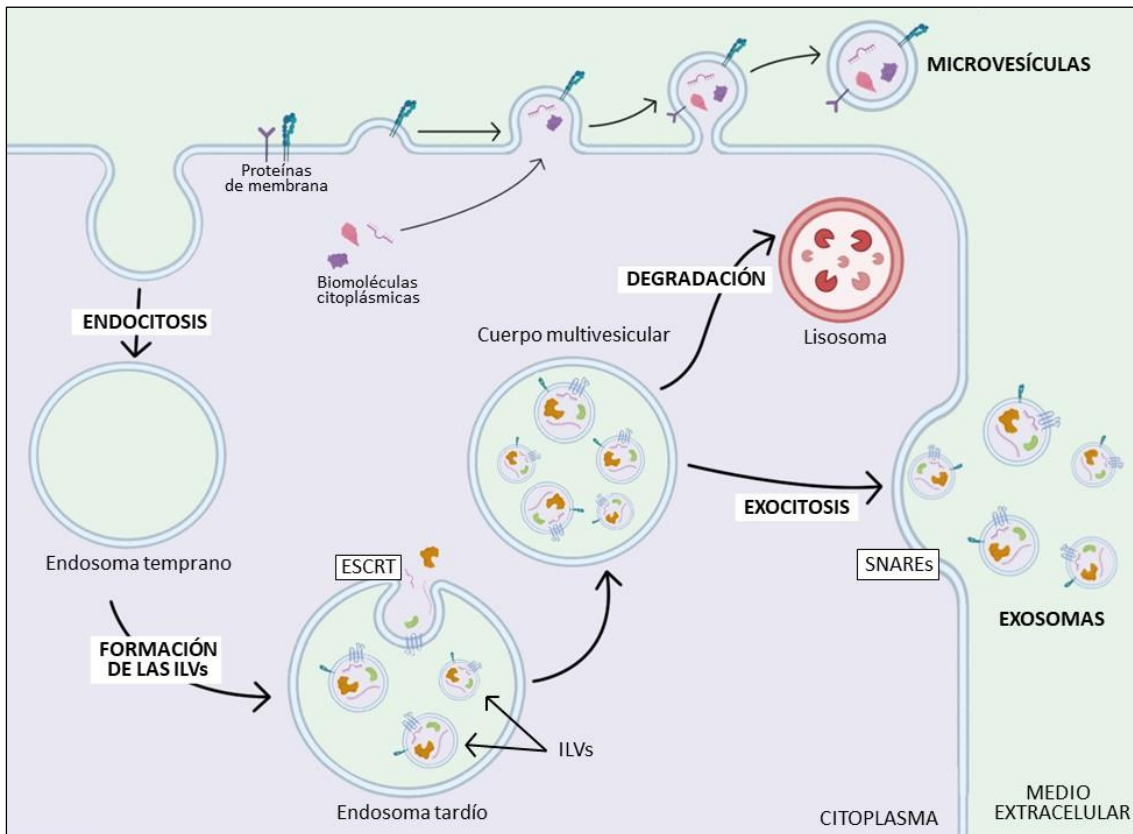


Figura 4. Biogénesis de microvesículas y exosomas. Las microvesículas se forman directamente por gemación de la membrana plasmática, proceso regulado por el Ca^{2+} intracelular. Los exosomas se generan a partir de la vía endosomal. En primer lugar, se forman vesículas intraluminales (ILVs) por invaginación de los endosomas, proceso regulado principalmente por ESCRT. Tras esto, se forman los cuerpos multivesiculares (MVBs) que pueden secretar su contenido al medio extracelular por medio de fusión con la membrana plasmática (exosomas) o pueden fusionarse con los lisosomas y degradarse. Figura realizada con *Biorender*.

4.2 Vesículas extracelulares: Bases moleculares en enfermedades alérgicas

Las VEs, y principalmente los exosomas, se han asociado desde hace tiempo a las enfermedades alérgicas⁽⁸⁹⁾. Los procesos de secreción y/o recepción de VEs en los cuales están implicados los mastocitos son especialmente importantes debido al papel que desempeñan estas células en la patología alérgica y la anafilaxia. Por un lado, se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que los exosomas derivados de mastocitos de la médula ósea estimulados por IL-4 producen la activación de linfocitos T y B⁽⁹⁰⁾. Al mismo tiempo, las MVs secretadas por linfocitos T activados inducen la degranulación y la liberación de citoquinas por parte de los mastocitos⁽⁹¹⁾.

También se ha observado que los exosomas de los mastocitos son capaces de inducir la maduración fenotípica y funcional de las CD8, promoviendo la presentación de antígenos y la generación de respuestas inmunes *in vivo*⁽⁹²⁾. Además, se ha descrito que, junto con otros factores solubles, son capaces de estimular células musculares de las vías respiratorias e inducir la secreción de citoquinas proinflamatorias en asma⁽⁹³⁾. Por otro lado, se ha atribuido cierta capacidad antialérgica a exosomas derivados de mastocitos, los cuales tienen receptores FcεRI y pueden competir por la unión de IgE libre. En un modelo murino de asma, los ratones tratados con ellos mostraban una disminución en los niveles de histamina en pulmón, IgE sérica y citoquinas Th2⁽⁹⁴⁾. Por tanto, queda patente que participan en la comunicación celular, y en concreto en la de los mastocitos modulando varios procesos celulares y moleculares subyacentes a las enfermedades alérgicas.

Uno de los procesos más estudiados de las VEs en las enfermedades alérgicas es su capacidad para transportar alérgenos y presentarlos directamente como si se tratasen de CPAs. Los exosomas derivados de linfocitos B de pacientes alérgicos a abedul contienen en su superficie moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) I y II. Su modificación *in vitro* con los principales epítomos del alérgeno Bet v 1 y la estimulación de linfocitos T de los propios pacientes con estas vesículas causaron un aumento en su proliferación y la secreción de citoquinas Th2⁽⁹⁵⁾. De forma similar, los exosomas derivados de CD8 modificados con el alérgeno de gato Fel f 1 indujeron la producción de citoquinas Th2 en linfocitos T estimulados con ellos⁽⁹⁶⁾. Por otro lado, los derivados de las células epiteliales de tracto intestinal contienen antígenos luminales como los principales alérgenos alimentarios. Estos muestran una tendencia muy alta a interactuar con las CD8 *in vitro* y mediante esto dan lugar a la activación de linfocitos T, lo que parece indicar que los exosomas tienen un papel importante en la activación del sistema inmune frente a los alérgenos alimentarios⁽⁹⁷⁾. Además, en el caso de la alergia a amoxicilina, se ha observado que las VEs derivadas de linfocitos B sirven como vehículo para proteínas hapténadas con este fármaco y podrían estar relacionadas con la activación del sistema inmune frente a él y el desarrollo de la alergia a los antibióticos β-lactámicos⁽⁹⁸⁾.

Los exosomas se han relacionado directamente con la patogénesis del asma. En pacientes asmáticos se ha observado una mayor cantidad de marcadores exosomales en el fluido de lavado broncoalveolar (BALF). Además, estas vesículas contienen enzimas implicadas en la síntesis de CysLTs como el LTC₄. Al estimular células epiteliales bronquiales (BECs) de pacientes asmáticos con ellas, se observó un aumento en los niveles de LTs e IL-8, lo que sugiere que podrían contribuir a la patogénesis del asma⁽⁹⁹⁾. La presencia de enzimas para la síntesis de CysLTs se ha detectado también en exosomas secretados por CD8 y macrófagos, donde además son mucho más activas y se encuentran en mayor cantidad que en las propias células. Estas vesículas tienen también la capacidad de reclutar granulocitos, probablemente mediante la liberación de factores quimiotácticos⁽¹⁰⁰⁾. La capacidad de los exosomas para favorecer la síntesis de CysLTs podría ser

de importancia en la anafilaxia ya que estos mediadores son clave en el desarrollo de la sintomatología respiratoria durante la reacción. En un modelo experimental de ratón asmático se observaron niveles elevados de exosomas y sus proteínas asociadas en BALF. La estimulación de BECs con IL-13 dio lugar a un aumento en la secreción de estas vesículas, las cuales además tenían la capacidad de inducir la proliferación de monocitos y aumentar la respuesta inflamatoria. Además, ensayos *in vivo* demostraron que el bloqueo de la biogénesis de los exosomas mediante el uso de un inhibidor específico de su formación alivia todas las características típicas de la inflamación alérgica de las vías respiratorias⁽¹⁰¹⁾. Estos cambios podrían deberse a modificaciones en la regulación génica de las células recipientes, ya que también se ha observado una desregulación de la expresión de una gran cantidad de miRNAs en los exosomas del BALF de pacientes asmáticos. Estos miRNAs desregulados muestran un perfil proinflamatorio y están implicados en la producción de citoquinas como la IL-13, vías de señalización como JAK-STAT y su expresión se correlaciona directamente con la función pulmonar. Además, usando 16 de estos miRNAs exosomales generaron un modelo diagnóstico con un poder predictivo del 72%⁽¹⁰²⁾. Por otro lado, las VEs de la mucosa nasal de pacientes con rinitis alérgica también presentan alteraciones en los niveles de los miRNAs⁽¹⁰³⁾, demostrando de nuevo que son importantes reguladores de enfermedades alérgicas.

Por otra parte, se ha observado que las VEs tienen función inmunoreguladora y pueden prevenir las enfermedades alérgicas mediante la inducción de la tolerancia y la supresión inmune. Estas VEs reciben el nombre de tolerosomas. Los exosomas del BALF de ratones a los que se les había inducido la tolerancia al alérgeno de olivo Ole e 1 se aislaron y se administraron intranasalmente a ratones a los que una semana más tarde se les realizó el protocolo de sensibilización/exposición. Esto inhibió completamente la formación de IgEs, la producción de citoquinas Th2, la infiltración de células inflamatorias en el pulmón y se produjo un aumento del factor de crecimiento transformante β (TGF β). Además, este perfil se mantenía a largo plazo, lo que convierte a los exosomas en interesantes candidatos para ser utilizados en la terapia anti-alérgica⁽¹⁰⁴⁾.

4.3 Vesículas extracelulares: biomarcadores de enfermedades alérgicas

Las VEs se encuentran en la mayoría de los fluidos corporales como la sangre, el plasma o el semen y están implicados en múltiples patologías, lo cual ha provocado un gran interés de su uso como biomarcadores diagnósticos o para el seguimiento de la progresión de múltiples enfermedades. Además, son muy estables y protegen su contenido de la degradación, lo que los convierte en biomarcadores ideales⁽¹⁰⁵⁾. Recientemente se ha comercializado para el caso del cáncer el primer método de diagnóstico a partir de exosomas libres en sangre⁽¹⁰⁶⁾. El diagnóstico mediante VEs puede estar basado en su composición o bien en su concentración. Un ejemplo del primer caso es el miRNA-217 exosomal y el RNA largo no codificante CRNDE-p, que se

expresan de forma diferencial en el suero de pacientes con carcinoma colorrectal y correlacionan con la clasificación del tumor, estado clínico y distancia de metástasis⁽¹⁰⁷⁾. Por otra parte, se ha determinado que la precisión para distinguir entre colangiocarcinoma maligno y benigno usando la concentración de VEs en la bilis es del 100%⁽¹⁰⁸⁾.

En el caso de las enfermedades alérgicas, el uso de VEs como biomarcador no ha sido tan explorado como los miRNAs y, además, lo más caracterizado ha sido el perfil de las moléculas contenidas en su interior, como en el caso de los exosomas del BALF de pacientes asmáticos⁽¹⁰²⁾. Cabe destacar que el uso de la concentración de VEs como biomarcador probablemente requiera de una gran cantidad de las mismas ya que la determinación de las VEs en el suero en lugar de en la bilis disminuye la precisión de detección de colangiocarcinoma al 60%⁽¹⁰⁸⁾.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

La anafilaxia es una reacción alérgica heterogénea y multifactorial con mecanismos moleculares complejos que no se conocen en su totalidad y cuyos métodos de diagnóstico actuales son poco fiables.

Los miRNAs han demostrado tener un papel muy importante en la patogénesis de las enfermedades alérgicas y la evidencia sugiere que también juegan un papel crucial en la anafilaxia a pesar de la escasez de estudios en ella. En esta reacción, estas moléculas pueden participar en la fase de sensibilización al alérgeno favoreciendo la respuesta Th2; en el inicio de la reacción, promoviendo y acelerando la degranulación de los mastocitos; e incluso en el desarrollo de algunos de los eventos fisiopatológicos más importantes como el aumento de la permeabilidad vascular y la vasodilatación. A pesar de esto, el potencial que tienen los miRNAs en la anafilaxia es todavía desconocido y se necesitan más estudios.

La patogénesis de las enfermedades alérgicas también está claramente influenciada por las VEs, las cuales en anafilaxia pueden participar promoviendo la síntesis *de novo* de leucotrienos o regulando la expresión génica de las células mediante la transferencia de miRNAs. Las VEs están implicadas en procesos de comunicación entre células del sistema inmune en los cuales se favorece el desarrollo de estas enfermedades. Tienen también capacidad para transportar y presentar alérgenos como si se tratasen de CPAs, así como función inmunoreguladora. Nuestro conocimiento en las bases de estas enfermedades avanzará indudablemente cuando integremos estos descubrimientos, y los que están por hacer, a todo lo ya previamente estudiado.

En lo que respecta al diagnóstico, los miRNAs están mostrando un gran potencial para ser desarrollados como nuevos biomarcadores no invasivos en enfermedades alérgicas como el asma. Lo mismo ocurre con el análisis del contenido de RNAs y proteínas en el interior de VEs. Si bien los miRNAs están actualmente más estudiados que las VEs, ambos se encuentran en fases prematuras para su implementación como biomarcadores, sobre todo en anafilaxia donde los primeros estudios se están comenzando a realizar ahora. Por lo tanto, todavía se necesita mucha más investigación para determinar su funcionalidad como biomarcadores sustitutivos o complementarios a la triptasa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Simons FE, Arduzzo LR, Bilo MB, Cardona V, Ebisawa M, El-Gamal YM, et al. International consensus on (ICON) anaphylaxis. *World Allergy Organ J* 2014;7:9.
2. LoVerde D, Iweala OI, Eginli A, Krishnaswamy G. Anaphylaxis. *Chest*. 2018 Feb;153(2):528-543
3. Vidigal JA, Ventura A. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol* 2015 MAR;25(3):137-147.
4. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009 JAN;19(1):92-105.
5. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013 Feb;200(4):373-383.
6. Rak J. Microparticles in Cancer. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2010 Nov;36(8):888-906
7. Sastre B, Canas JA, Rodrigo-Munoz JM, del Pozo V. Novel Modulators of Asthma and Allergy: Exosomes and MicroRNAs. *Frontiers in Immunology* 2017;8:826.
8. Huang W. MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics. *Bioinformatics in Microrna Research* 2017;1617:57-67
9. Tejedor-Alonso MA, Moro-Moro M, Mugica-Garcia MV. Epidemiology of Anaphylaxis: Contributions From the Last 10 Years. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 2015 Jan 1,;25(3):163-175.
10. Tejedor Alonso MA, Moro Moro M, Mugica Garcia MV, Esteban Hernandez J, Rosado Ingelmo A, Vila Albelda C, et al. Incidence of anaphylaxis in the city of Alcorcon (Spain): a population-based study. *Clinical and Experimental Allergy* 2012 APR;42(4):578-589
11. Lieberman P, Camargo CA Jr, Bohlke K, et al. Epidemiology of anaphylaxis: findings of the American College of Allergy, Asthma and Immunology Epidemiology of Anaphylaxis Working Group. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006;97(5):596-602
12. Lieberman PL. Recognition and First-Line Treatment of Anaphylaxis. *The American journal of medicine* 2014;127(1):S6-S11.
13. Muraro A, Roberts G, Worm M, Bilò MB, Brockow K, Fernández Rivas M, Santos AF, Zolkipli ZQ, Bellou A, Beyer K, Bindslev-Jensen C, Cardona V, Clark AT, Demoly P, Dubois AE, DunnGalvin A, Eigenmann P, Halken S, Harada L, Lack G, Jutel M, Niggemann B, Ruëff F, Timmermans F, Vlieg-Boerstra BJ, Werfel T, Dhami S, Panesar S, Akdis CA, Sheikh A; EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. Anaphylaxis: guidelines from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy*. 2014 Aug;69(8):1026-1045
14. Bilò MB, Martini M, Tontini C, Mohamed OE, Krishna MT. Idiopathic anaphylaxis. *Clin Exp Allergy*. 2019 Jul;49(7):942-952
15. Feldweg AM. Exercise-induced anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin N Am*. 2015;35(2):261–75.
16. Wanderer AA. Cold urticaria syndromes: historical background, diagnostic classification, clinical and laboratory characteristics, pathogenesis, and management. *J Allergy Clin Immunol*. 1990 Jun;85(6):965-981
17. Reber LL, Hernandez JD, Galli SJ. The pathophysiology of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Aug;140(2):335-348.
18. Lee S, Sadosty AT, Campbell RL. Update on biphasic anaphylaxis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2016 AUG;16(4):346-351.
19. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 2012 MAY;18(5):693-704.

20. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2010 FEB;125(2):S116-S125.
21. Miyajima I, Dombrowicz D, Martin TR, Ravetch JV, Kinet JP, Galli SJ. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *J Clin Invest.* 1997 Mar 1;99(5):901-914
22. Jönsson F, de Chaisemartin L, Granger V, Gouel-Chéron A, Gillis CM, Zhu Q, Dib F, Nicaise-Roland P, Ganneau C, Hurtado-Nedelec M, Paugam-Burtz C, Necib S, Keita-Meyer H, Le Dorze M, Cholley B, Langeron O, Jacob L, Plaud B, Fischler M, Sauvan C, Guinnepain MT, Montravers P, Aubier M, Bay S, Neukirch C, Tubach F, Longrois D, Chollet-Martin S, Bruhns P. An IgG-induced neutrophil activation pathway contributes to human drug-induced anaphylaxis. *Sci Transl Med.* 2019 Jul 10;11(500):eaat1479
23. Brown SGA, Stone SF, Fatovich DM, Burrows SA, Holdgate A, Celenza A, et al. Anaphylaxis: Clinical patterns, mediator release, and severity. *J Allergy Clin Immunol* 2013 NOV;132(5):1141- +
24. Turner H, Kinet JP. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilon RI. *Nature* 1999 NOV 25;402(6760):B24-B30.
25. Schroeder JT. Basophils: emerging roles in the pathogenesis of allergic disease. *Immunol Rev* 2011 JUL;242:144-160.
26. Finkelman FD, Khodoun MV, Strait R. Human IgE-independent systemic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2016 JUN;137(6):1674-1680.
27. Strait RT, Morris SC, Yang MY, Qu XW, Finkelman FD. Pathways of anaphylaxis in the mouse. *J Allergy Clin Immunol* 2002 APR;109(4):658-668.
28. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microb Infect* 2003 NOV;5(14):1317-1327.
29. Francis A, Bosio E, Stone SF, Fatovich DM, Arendts G, Nagree Y, et al. Neutrophil activation during acute human anaphylaxis: analysis of MPO and sCD62L. *Clinical and Experimental Allergy* 2017 MAR;47(3):361-370.
30. Kasperska-Zajac A, Rogala B. Platelet function in anaphylaxis. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 2006;16(1):1-4.
31. Kaliner M, Sigler R, Summers R, Shelhamer JH. Effects of infused histamine: analysis of the effects of H-1 and H-2 histamine receptor antagonists on cardiovascular and pulmonary responses. *J Allergy Clin Immunol.* 1981 Nov;68(5):365-371.
32. Montrucchio G, Alloatti G, Camussi G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* 2000 OCT;80(4):1669-1699
33. Gill P, Jindal NL, Jagdis A, Vadas P. Platelets in the immune response: Revisiting platelet-activating factor in anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2015 JUN;135(6):1424-1432.
34. Weiss JW, Drazen JM, Coles N, Mcfadden ER, Weller PF, Corey EJ, et al. Bronchoconstrictor Effects of Leukotriene-C in Humans. *Science* 1982;216(4542):196-198
35. Sampson HA, munos-furlong A, Campbell RL, Adkinson NF, Bock SA, Branum A, et al. Second Symposium of the Definition and Management of Anaphylaxis: Summary report – Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network Symposium. *Ann Emerg Med* 2006 Apr;47(4):373-380

36. Sargant N, Erlewyn-Lajeunesse M, Bengner J. Does anaphylaxis masquerade as asthma in children? *Emerg Med J*. 2015 Jan;32(1):83-84
37. Wang J, Young MC, Nowak-Wegrzyn A. International survey of knowledge of food-induced anaphylaxis. *Pediatric Allergy and Immunology* 2014 NOV;25(7):644-650.
38. Schwartz LB. Diagnostic value of tryptase in anaphylaxis and mastocytosis. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 2006 AUG;26(3):451-+.
39. Castells M. Diagnosis and management of anaphylaxis in precision medicine. *J Allergy Clin Immunol* 2017 AUG;140(2):321-333
40. Lieberman P, et al. The diagnosis and management of anaphylaxis practice parameter 2010 update. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 477-80
41. Simons FER, Ebisawa M, Sanchez-Borges M, Thong BY, Worm M, Tanno LK, et al. 2015 update of the evidence base: World Allergy Organization anaphylaxis guidelines. *World Allergy Organization Journal* 2015 OCT 28;8.
42. Fleming JT, Clark S, Camargo CA Jr, Rudders SA. Early treatment of food-induced anaphylaxis with epinephrine is associated with a lower risk of hospitalization. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2015 Jan-Feb;3(1):57-62
43. Westfall TC. Adrenergic agonists and antagonists. In: Chabner BA, Brunton LL, Knollmann BC, editors. *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: Mc Graw-Hill, 2006: 215–268
44. Thomas M, Crawford I. Best evidence topic report. Glucagon infusion in refractory anaphylactic shock in patients on beta-blockers. *Emerg Med J*. 2005 Apr;22(4):272-3.
45. Liyanage CK, Galappatthy P, Seneviratne SL. Corticosteroids in management of anaphylaxis; a systematic review of evidence. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology* 2017 SEP;49(5):196-207.
46. Runge JW, Martinez JC, Caravati EM, Williamson SG, Hartsell SC. Histamine-Antagonists in the Treatment of Acute Allergic Reactions. *Ann Emerg Med* 1992 MAR;21(3):237-242.
47. Campbell RL, Li JTC, Nicklas RA, Sadosty AT, Joint Task Force, Practice Parameter Workgrp. Emergency department diagnosis and treatment of anaphylaxis: a practice parameter. *Annals of Allergy Asthma & Immunology* 2014;113(6):599-608
48. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014 AUG;15(8):509-524.
49. Lee H, Han S, Kwon CS, Lee D. Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein & Cell* 2016 FEB;7(2):100-113.
50. Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. *The J Allergy Clin Immunol* 2018 Apr;141(4):1202-1207.
51. Rebane A, Akdis C. MicroRNAs in Allergy and Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014 Apr;14(4):1-9.
52. Biethahn K, Orinska Z, Vigorito E, Goyeneche-Patino DA, Mirghomizadeh F, Foeger N, et al. miRNA-155 controls mast cell activation by regulating the PI3K gamma pathway and anaphylaxis in a mouse model. *Allergy* 2014 JUN;69(6):752-762.
53. Lu TX, Munitz A, Rothenberg ME. MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2009 Apr 15;182(8):4994-5002.

54. Lu TX, Sherrill JD, Wen T, Plassard AJ, Besse JA, Abonia JP, et al. MicroRNA signature in patients with eosinophilic esophagitis, reversibility with glucocorticoids, and assessment as disease biomarkers. *J Allergy Clin Immunol* 2012 Apr;129(4):1064-1075.
55. Sawant DV, Yao W, Wright Z, Sawyers C, Tepper RS, Gupta SK, et al. Serum MicroRNA-21 as a Biomarker for Allergic Inflammatory Disease in Children. *MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates)* 2015;4(1):36.
56. Mattes J, Collison A, Plank M, Phipps S, Foster PS. Antagonism of microRNA-126 suppresses the effector function of TH2 cells and the development of allergic airways disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* 2009 Nov;106(44):18704-18709.
57. Tian M, Ji Y, Wang T, Zhang W, Zhou Y, Cui Y. Changes in circulating microRNA-126 levels are associated with immune imbalance in children with acute asthma. *International journal of immunopathology and pharmacology* 2018;32:205873841877924-2058738418779243.
58. Bao Y, Wang S, Gao Y, Zhang W, Jin H, Yang Y, et al. MicroRNA-126 accelerates IgE-mediated mast cell degranulation associated with the PI3K/Akt signaling pathway by promoting Ca²⁺ influx. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2018 Sep;16(3):2763-2769.
59. Zhou Y, Yang Q, Xu H, Zhang J, Deng H, Gao H, et al. miRNA-221-3p Enhances the Secretion of Interleukin-4 in Mast Cells through the Phosphatase and Tensin Homolog/p38/Nuclear Factor-kappaB Pathway. *PloS one* 2016 Feb;11(2):e0148821.
60. Xu H, Gu L, Yang Q, Zhao D, Liu F. MiR-221 promotes IgE-mediated activation of mast cells degranulation by PI3K/Akt/PLC[³]/Ca²⁺ pathway. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 2016 Jun;48(3):293.
61. Wang T, Chen D, Wang P, Xu Z, Li Y. miR-375 prevents nasal mucosa cells from apoptosis and ameliorates allergic rhinitis via inhibiting JAK2/STAT3 pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy* 2018 Jul;103:621-627.
62. Kumar M, Ahmad T, Sharma A, Mabalirajan U, Kulshreshtha A, Agrawal A, et al. Let-7 microRNA-mediated regulation of IL-13 and allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2011 Nov;128(5):1077-1085
63. Lu L, Boldin MP, Chaudhry A, Lin L, Taganov KD, Hanada T, et al. Function of miR-146a in Controlling Treg Cell-Mediated Regulation of Th1 Responses. *Cell* 2010 Sep;142(6):914-929.
64. Panganiban RP, BS, Wang Y, BS, Howrylak, Judie, MD, PhD, Chinchilli VM, PhD, Craig TJ, DO, August A, PhD, et al. Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2016 May;137(5):1423-1432
65. Chiba Y, Tanabe M, Goto K, Sakai H, Misawa M. Down-Regulation of miR-133a Contributes to Up-Regulation of RhoA in Bronchial Smooth Muscle Cells. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2009 Oct;180(8):713-719.
66. Malmhall C, Alawieh S, Lu Y, Sjostrand M, Bossios A, Eldh M, et al. MicroRNA-155 is essential for T.sub.H2-mediated allergen-induced eosinophilic inflammation in the lung. *J Allergy Clin Immunol* 2014 May,;133(5):1429.
67. Okoye IS, Czieso S, Ktistaki E, Roderick K, Coomes SM, Pelly VS, et al. Transcriptomics identified a critical role for Th2 cell-intrinsic miR-155 in mediating allergy and antihelminth immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* 2014;111(30):E3081-E3090.

68. Johansson K, Malmhäll C, Ramos-Ramírez P, Rådinger M. MicroRNA-155 is a critical regulator of type 2 innate lymphoid cells and IL-33 signaling in experimental models of allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2017;139(3):1007-1016
69. Malmhäll C, Johansson K, Winkler C, Alawieh S, Ekerljung L, Rådinger M. Altered miR-155 Expression in Allergic Asthmatic Airways. *Scandinavian Journal of Immunology* 2017 Apr;85(4):300-307
70. Sonkoly E, Janson P, Majuri M, Savinko T, Fyhrquist N, Eidsmo L, et al. MiR-155 is overexpressed in patients with atopic dermatitis and modulates T-cell proliferative responses by targeting cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126(3):581-589
71. Wang X, Chen Y, Yuan W, Yao L, Wang S, Jia Z, et al. MicroRNA-155-5p is a key regulator of allergic inflammation, modulating the epithelial barrier by targeting PKI α . *Cell death & disease* 2019 Nov;10(12):1-14
72. Zheng B, Yin W, Suzuki T, Zhang X, Zhang Y, Song L, et al. Exosome-Mediated miR-155 Transfer from Smooth Muscle Cells to Endothelial Cells Induces Endothelial Injury and Promotes Atherosclerosis. *Molecular Therapy* 2017 Jun;25(6):1279-1294.
73. Zhang J, Fei Z, Xiaoling Y, Xiang L, Goufeng Z. MicroRNA-155 modulates the proliferation of vascular smooth muscle cells by targeting endothelial nitric oxide synthase. *International Journal of Molecular Medicine* 2015 Jun;35(6):1708-1714.
74. Pfeffer SR, Yang CH, Pfeffer LM. The Role of miR-21 in Cancer. *Drug Dev Res* 2015;76(6):270-277.
75. Jia M, Chu C, Wang M. Correlation of microRNA profiles with disease risk and severity of allergic rhinitis. *International journal of clinical and experimental pathology* 2018;11(3):1791.
76. He P, Ni J, Zhao H, Jin X. Diagnostic value of miR-221 and miR-142-3p expressions of allergic rhinitis, and miR-221 level is positively correlated with disease severity. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2017;10(5):7834-7842.
77. McGeachie MJ, Ph.D, Davis JS, MD, Kho AT, Ph.D, Dahlin A, Ph.D, Sordillo JE, Sc.D, Sun M, Ph.D, et al. Asthma Remission: Predicting Future Airways Responsiveness using a miRNA Network. *J Allergy Clin Immunol*, 2017 Aug;140(2):598-600.e8.
78. Specjalski K, Maciejewska A, Pawłowski R, Chelmińska M, Jassem E. Changes in the Expression of MicroRNA in the Buildup Phase of Wasp Venom Immunotherapy: A Pilot Study. *International Archives of Allergy and Immunology* 2016 Aug;170(2):97-100.
79. Tricarico C, Clancy J, D'Souza-Schorey C. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases* 2016 Aug;8(4):220-232
80. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(4):213-228
81. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2004 Nov 1;104(9):2761-2766.
82. Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J* 2011 Aug 31;30(17):3481-3500.
83. Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, Ivarsson Y, Depoortere F, Coomans C, Vermeiren E, Zimmermann P, David G. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol.* 2012 Jun 3;14(7):677-685.

84. Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem.* 1998 Aug 7;273(32):20121-20127.
85. Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Developmental Cell* 2007 May;12(5):671-682.
86. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007 Jun;9(6):654-U72.
87. Ludwig A, Giebel B. Exosomes: Small vesicles participating in intercellular communication. *Int J Biochem Cell Biol* 2012 Jan;44(1):11-15.
88. Coleman BM, Hill AF. Extracellular vesicles - Their role in the packaging and spread of misfolded proteins associated with neurodegenerative diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2015 Apr;40:89-96.
89. Admyre C, Telemo E, Almqvist N, Lötvall J, Lahesmaa R, Scheynius A, Gabrielsson S. Exosomes - nanovesicles with possible roles in allergic inflammation. *Allergy.* 2008 Apr;63(4):404-408.
90. Skokos D, Le Panse S, Villa I, Rousselle J, Peronet R, David B, et al. Mast Cell-Dependent B and T Lymphocyte Activation Is Mediated by the Secretion of Immunologically Active Exosomes. *Journal of Immunology* 2001 Jan 15;166(2):868-876.
91. Shefler I, Salamon P, Reshef T, Mor A, Mekori YA. T Cell-Induced Mast Cell Activation: A Role for Microparticles Released from Activated T Cells. *Journal of Immunology* 2010 Oct 1;185(7):4206-4212.
92. Skokos D, Botros HG, Demeure C, Morin J, Peronet R, Birkenmeier G, et al. Mast Cell-Derived Exosomes Induce Phenotypic and Functional Maturation of Dendritic Cells and Elicit Specific Immune Responses In Vivo. *Journal of Immunology* 2003 Mar ;170(6):3037-3045.
93. Xia YC, Harris T, Stewart AG, Mackay GA. Secreted Factors from Human Mast Cells Trigger Inflammatory Cytokine Production by Human Airway Smooth Muscle Cells. *International archives of allergy and immunology* 2013;160(1):75-85.
94. Xie G, Yang H, Peng X, Lin L, Wang J, Lin K, Cui Z, Li J, Xiao H, Liang Y, Li L. Mast cell exosomes can suppress allergic reactions by binding to IgE. *J Allergy Clin Immunol.* 2018 Feb;141(2):788-791
95. Admyre C, Bohle B, Johansson SM, Focke-Tejkl M, Valenta R, Scheynius A, et al. B cell-derived exosomes can present allergen peptides and activate allergen-specific T cells to proliferate and produce TH2-like cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2007 Dec;120(6):1418-1424
96. Vallhov H, Gutzeit C, Hultenby K, Valenta R, Grönlund H, Scheynius A. Dendritic cell-derived exosomes carry the major cat allergen Fel d 1 and induce an allergic immune response. *Allergy* 2015 Dec;70(12):1651-1655
97. Mallegol J, Van Niel G, Lebreton C, Lepelletier Y, Candalh C, Dugave C, et al. T84-Intestinal Epithelial Exosomes Bear MHC Class II/Peptide Complexes Potentiating Antigen Presentation by Dendritic Cells. *Gastroenterology* 2007 May;132(5):1866-1876.
98. Sánchez-Gómez FJ, González-Morena JM, Vida Y, Pérez-Inestrosa E, Blanca M, Torres MJ, et al. Amoxicillin haptens intracellular proteins that can be transported in exosomes to target cells. *Allergy* 2017 Mar;72(3):385-396.

99. Torregrosa Paredes P, Esser J, Admyre C, Nord M, Rahman QK, Lukic A, et al. Bronchoalveolar lavage fluid exosomes contribute to cytokine and leukotriene production in allergic asthma. *Allergy* 2012 Jul;67(7):911-919.
100. Esser J, Gehrman U, D'Alexandri FL, Hidalgo-Estévez AM, Wheelock CE, Scheynius A, et al. Exosomes from human macrophages and dendritic cells contain enzymes for leukotriene biosynthesis and promote granulocyte migration. *J Allergy Clin Immunol* 2010 Nov;126(5):1032-1040.
101. Kulshreshtha A, Ahmad T, Agrawal A, Ghosh B. Proinflammatory role of epithelial cell-derived exosomes in allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2013 Apr;131(4):1194-1203
102. Levänen B, Bhakta NR, Torregrosa Paredes P, Barbeau R, Hiltbrunner S, Pollack JL, et al. Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2013 Mar;131(3):894-903.
103. Wu G, Yang G, Zhang R, Xu G, Zhang L, Wen W, et al. Altered microRNA Expression Profiles of Extracellular Vesicles in Nasal Mucus From Patients With Allergic Rhinitis. *Allergy, asthma & immunology research* 2015 Sep;7(5):449-457.
104. Prado N, Marazuela EG, Segura E, Fernandez-Garcia H, Villalba M, Thery C, et al. Exosomes from Bronchoalveolar Fluid of Tolerized Mice Prevent Allergic Reaction. *The Journal of Immunology* 2008 Jul;181(2):1519-1525
105. De Toro J, Herschlik L, Waldner C, Mongini C. Emerging Roles of Exosomes in Normal and Pathological Conditions: New Insights for Diagnosis and Therapeutic Applications. *Frontiers in immunology* 2015 May;6:203
106. Sheridan C. Exosome cancer diagnostic reaches market. *Nat Biotechnol* 2016 Apr;34(4):358-359
107. Yu B, Du Q, Li H, Liu H, Ye X, Zhu B, et al. Diagnostic potential of serum exosomal colorectal neoplasia differentially expressed long non-coding RNA (CRNDE-p) and microRNA-217 expression in colorectal carcinoma. *Oncotarget* 2017 Oct 13;8(48):83745-83753.
108. Severino V, Dumonceau J, Delhaye M, Moll S, Annessi-Ramseyer I, Robin X, et al. Extracellular Vesicles in Bile as Markers of Malignant Biliary Stenoses. *Gastroenterology* 2017 Aug;153(2):495-+.