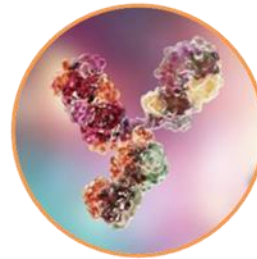
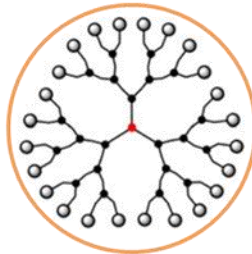


Estudios de la modulación de la respuesta inmunológica y desarrollo de modelos de tolerancia a alérgenos de origen vegetal utilizando nanoestructuras polifuncionales




Tesis Doctoral

María José Rodríguez Sánchez



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: María José Rodríguez Sánchez

 <http://orcid.org/0000-0003-0090-0642>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



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

<http://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



Universidad de Málaga

Facultad de Medicina

Biomedicina, Investigación Traslacional y Nuevas Tecnologías en Salud



TESIS DOCTORAL

**Estudios de la modulación de la respuesta
inmunológica y desarrollo de modelos de
tolerancia a alérgenos de origen vegetal
utilizando nanoestructuras polifuncionales**

María José Rodríguez Sánchez

Directora
Cristobalina Mayorga
Mayorga

Directora
María José Torres
Jaén

Tutor
Antonio Fernández
Nebro

Málaga, 2020

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Hospital Regional Universitario
CARLOS HAYA
Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD



Doña María José Torres Jaén, Doctora en Medicina y Cirugía y Doña Cristobalina Mayorga Mayorga, Doctora en Biología

CERTIFICAN:

Que el trabajo que presenta **María José Rodríguez Sánchez** con el título **“Estudios de la modulación de la respuesta inmunológica y desarrollo de modelos de tolerancia a alérgenos de origen vegetal utilizando nanoestructuras polifuncionales”**, ha sido realizado bajo nuestra dirección, y consideramos que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste firmamos el presente certificado en Málaga a 17 de Diciembre de 2019.

Fdo. María José Torres Jaén

Fdo. Cristobalina Mayorga Mayorga



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Hospital Regional Universitario
CARLOS HAYA
Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD



Don Antonio Fernández Nebro, Doctor en Medicina y Cirugía

CERTIFICA:

Que el trabajo que presenta **María José Rodríguez Sánchez** con el título **“Estudios de la modulación de la respuesta inmunológica y desarrollo de modelos de tolerancia a alérgenos de origen vegetal utilizando nanoestructuras polifuncionales”**, ha sido realizado bajo mi tutela y considero que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste firmo el presente certificado en Málaga a 17 de Diciembre de 2019.

Fdo. Dr. Antonio Fernández Nebro



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Hospital Regional Universitario
CARLOS HAYA
Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD



Yo, **María José Rodríguez Sánchez**, declaro que soy autora del presente trabajo de investigación cuyo título es **“Estudios de la modulación de la respuesta inmunológica y desarrollo de modelos de tolerancia a alérgenos de origen vegetal utilizando nanoestructuras polifuncionales”**, que ha sido realizado bajo la dirección de la Dra. María José Torres Jaén y la Dra. Cristobalina Mayorga y bajo la tutela del Dr. Antonio Fernández Nebro.

Y para que así conste firmo el presente certificado en Málaga a 17 de Diciembre de 2019.

Fdo. María José Rodríguez Sánchez



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

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

Artículos científicos

1. **Rodríguez MJ**, Aranda A, Fernández TD, Cubells-Baeza N, Torres MJ, Gómez F, Palomares F, Perkins JR, Rojo J, Díaz-Perales A, Mayorga C. LPS promotes Th2 dependent sensitization leading to anaphylaxis in a Pru p 3 mouse model. *Scientific Reports*, 2017 Jan 13, 7:40449. DOI: 10.1038/srep40449. Q1, Factor Impacto: 4.122. (Anexo 1)
2. **Rodríguez MJ**, Mascaraque A, Ramos-Soriano FJ, Torres MJ, Perkins JR, Gómez F, Garrido M, Cubells N, Andreu D, Díaz-Perales A, Rojo J, Mayorga C. Pru p 3-Epitope-based sublingual immunotherapy in a murine model for the treatment of peach allergy. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2017 Jun 6. 61 (10). DOI: 10.1002/mnfr.201700110. D1, Factor Impacto: 5.151. (Anexo 2)
3. **Rodríguez MJ**, Ramos-Soriano J, Perkins JR, Mascaraque A, Torres MJ, Gómez F, Díaz-Perales A, Rojo J, Mayorga C. Glycosylated nanostructures in sublingual immunotherapy induce longlasting tolerance in LTP allergy mouse model. *Scientific Reports*, 2019 Mar 11, 9:4043. DOI: 10.1038/s41598-019-40114-7. Q1, Factor Impacto: 4.122. (Anexo 3)

Comunicaciones a congresos

1. Cristobalina Mayorga, Ana Aranda, **María J Rodríguez**, Tahia D Fernández, Nuria Cubells-Baeza, María J Torres, Francisca Gómez, Francisca Palomares, Javier Rojo, Miguel Blanca, Araceli Díaz-Perales. LPS promotes the generation to Pru p 3 anaphylactic mouse model. 34th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI). 6-10 Junio 2015. Barcelona. (Anexo 4)
2. Cristobalina Mayorga, Ana Aranda, **María J Rodríguez**, Tahia D Fernández, Nuria Cubells-Baeza, María J Torres, Francisca Gómez, Francisca Palomares, Javier Rojo, Miguel Blanca, Araceli Díaz-Perales. LPS promotes the generation to Pru p 3 anaphylactic mouse model. 4th European Congress of Immunology (ECI). 6-9 Septiembre 2015. Viena, Austria. (Anexo 5)
3. **Rodríguez MJ**, Aranda A, Fernandez TD, Cubells-Baeza N, Molina A, Torres MJ, Gomez F, Palomares F, Rojo J, Blanca M, Diaz-Perales A, Mayorga C. Low levels of LPS Promotes a



4. Th2 Sensitization to Pru p 3 generating Anaphylactic Mice. 2016 AAAAI Annual Meeting. 4-7 Marzo 2016. Los Angeles, EEUU. (Anexo 6)
5. Cristobalina Mayorga, **María J Rodríguez**, Tahia D Fernández, María J Torres, Francisca Gómez, Francisca Palomares Nuria Cubells-Baeza, James R Perkins, Javier Rojo, Araceli Díaz-Perales. LPS promotes a Th2 dependent sensitisation leading to anaphylaxis in a Pru p 3 mouse model. 4th Food Allergy and Anaphylaxis Meeting. 13-15 Octubre 2016. Roma, Italia. (Anexo 7)
6. James R Perkins, **María José Rodríguez**, Francisca Palomares, Francisca Gómez, Ana Molina, Miguel González, María J Torres, and Dr. Cristobalina Mayorga. Gene expression profiling of a Pru p 3-induced anaphylaxis model. 2017 AAAAI Annual Meeting. 2-6 Marzo 2017. Atlanta, EEUU. (Anexo 8)
7. **Rodríguez MJ**, Mascaraque A, Ramos-Soriano J, Torres MJ, Perkins JR, Gómez F, Garrido M, Molina A, Andreu D, Díaz-Perales A, Rojo J, Mayorga C. Pru p 3-Epitope-based Immunotherapy in murine model for the treatment of peach allergy. 36th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI). 17-21 Junio 2017. Helsinki, Finlandia. (Anexo 9)
8. **Rodríguez MJ**, Rodríguez-Nogales A, Molina A, Torres MJ, Mayorga C. Tolerance induction to peach using glycosylated nanostructures including Pru p 3-Epitope. 12th annual event of the ETPN (European Technology Platform Nanomedicine). 17-19 Octubre 2017. Málaga. (Anexo 10)
9. **Rodríguez MJ**, Molina A, Ramos-Soriano J, Mascaraque A, Rodríguez-Nogales A, Díaz-Perales A, Perkins JR, Torres MJ, Rojo J, Mayorga C. Glycosylated nanostructures including Pru p 3-epitopes induce tolerance to peach in murine model. 16th EAACI Immunology Winter School "Basic Immunology Research in Allergy and Clinical Immunology". 25-28 Enero 2018. Saas-Fee, Suiza. (Anexo 11)
10. **Rodríguez MJ**, Ramos-Soriano J, Molina A, Mascaraque A, Gonzalez M, Díaz-Perales A, Perkins JR, Torres MJ, Rojo J, Mayorga C. Tolerance induction to peach using glycosylated nanostructures including Pru p 3-Epitope. 2018 AAAAI/WAO Joint Congress. 2-6 Marzo 2018. Orlando, EEUU. (Anexo 12)



11. Palomares F, Gómez F, Mascaraque A, Bogas G, Ramos-Soriano J, **Rodríguez MJ**, Torres MJ, Rojo J, Mayorga C. Immunological changes induced by Pru p 3-Glycodendrimers. 2018 AAAAI/WAO Joint Congress. 2-6 Marzo 2018. Orlando, EEUU. (Anexo 13)
12. **Rodríguez MJ**, Ramos-Soriano J, Molina A, Mascaraque A, González M, Díaz-Perales A, Perkins JR, Rodríguez-Nogales A, Torres MJ, Rojo J, Mayorga C. Tolerance induction to peach using glycosylated nanostructures including Pru p 3-Epitope. 37th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI). 26-30 Mayo 2018. Múnich, Alemania. (Anexo 14)
13. **Rodríguez MJ**, Molina A, Gómez F, Torres MJ, Rojo J, Mayorga C. Inducción de tolerancia al melocotón en un modelo murino utilizando nanoestructuras glicosiladas que incluyen epítomos de Pru p 3. XXXI Congreso de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica. 24-27 Octubre 2018. Valencia. (Anexo 15)
14. **Rodríguez MJ**, Ramos-Soriano J, Molina A, Mascaraque A, Diaz-Perales A, Perkins JR, Rodríguez-Nogales A, Torres MJ, Rojo J, Mayorga C. Including glycosylated nanostructures in specific immunotherapy induces long-lasting tolerance in LTP allergy. Food Allergy and Anaphylaxis Meeting (EAACI). 18-20 Octubre 2018. Copenhague, Dinamarca. (Anexo 16)
15. Perkins JR, **Rodríguez MJ**, Rodríguez-Nogales A, Molina A, Palomares F, Díaz-Perales A, Torres MJ, Rojo J, Mayorga C. Transcriptional changes during allergen specific immunotherapy in a mouse model of Pru p 3 Allergy. 38th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI). 1-5 Junio 2019. Lisboa, Portugal. (Anexo 17)



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Este trabajo es fruto del esfuerzo, la dedicación y el apoyo de mucha gente y por ello quiero agradecer cada granito de arena que ha hecho posible que esta tesis fuera una realidad.

En primer lugar, quiero agradecer a Pepa y Lina su labor como directoras. Desde el principio confiasteis en mí y quiero agradecer ese apoyo, la confianza puesta en mí y todo lo que me habéis enseñado a lo largo de estos años. Gracias por todo lo aprendido y por haberme dado la oportunidad de formarme con vosotras.

Agradecer también al Dr. Fernández-Nebro por su colaboración como tutor de esta tesis.

Dar las gracias al Dr. Javier Rojo y a todo su equipo de Sevilla, por facilitarnos las estructuras utilizadas en los experimentos que conforman esta tesis.

Gracias a todos mis compañeros y amigos del laboratorio (los que están y los que se fueron), sin vosotros esto no habría sido lo mismo. Gracias a vosotros el día a día se lleva mucho mejor, ese apoyo incondicional, ese ánimo cuando alguien lo necesita y esa alegría que desprendéis... de verdad, habéis hecho que estos años hayan sido de los mejores de mi vida. Gracias por ayudarme a mejorar, no sólo a nivel científico sino también a nivel personal. Aunque el destino nos ponga a cada uno en un laboratorio, siempre seréis una parte fundamental de mí.

Gracias a mis padres, incansables compañeros de batalla. Lo mejor que me podía dar la vida. Gracias a vosotros soy todo lo que veis hoy. Me habéis enseñado a ser una guerrera y a luchar por lo que quiero disfrutando cada segundo del camino. Gracias por darme alas y por ayudarme siempre a perseguir mis sueños, me habéis enseñado y demostrado que la familia es lo primero.

Hermana, gracias por ser mi ejemplo a seguir. Gracias por enseñarme a disfrutar de la vida, venga como venga y sea en el lugar que sea. Que la vida nos pille viajando.

A ti. Eres la pieza clave de esta aventura, sin ti estoy segura de que hoy no estaría aquí. Esta tesis supuso para nosotros un cambio de vida, de trabajo, de ciudad, estar lejos de todos y de todo. Te daré las gracias eternamente por no dudarlo un momento y vivir ese cambio conmigo. Gracias por hacerme sonreír en los momentos no tan buenos, en mis agobios y en mis dudas y por darme siempre la fuerza necesaria para seguir luchando por mis sueños (juntos podemos con todo). No existe para mí un mejor compañero de vida, ¡eres increíble!

A mis ratoncillos. A todos esos pequeños animalitos que han hecho posible esta tesis y a todos los animales que hacen posible que la ciencia y la investigación avancen. Gracias y perdón.

GRACIAS

ABREVIATURAS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AA: Alergia a alimentos
CD: Células Dendríticas
CLR: Del inglés "*C-type lectin receptors*"
CPA: Célula Presentadora de Antígenos
DC-SIGN: Del inglés "*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*"
FcεRI: Receptor de alta afinidad para la fracción Fc de IgE
FoxP3: Del inglés "*forkhead box P3*"
GM-CSF: Del inglés "*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*"
HLA: Antígenos Leucocitarios Humanos
IFN-γ: Interferón gamma
Ig: Inmunoglobulina
IgEe: Inmunoglobulina E específica
IL: Interleuquina
IT: Inmunoterapia
ITE: Inmunoterapia Específica
ITEC: Inmunoterapia Epicutánea
ITO: Inmunoterapia Oral
ITSC: Inmunoterapia Subcutánea
ITSL: Inmunoterapia Sublingual
LPS: Lipopolisacárido
LTP: Del inglés "*Lipid Transfer Proteins*"
MHC: Del inglés "*Major Histocompatibility Complex*"
MIP: Del inglés "*Macrophage Inflammatory Proteins*"
NIAID: Del inglés "*National Institute Allergic and Infectious Diseases*"
NK: Del inglés "*Natural Killer*"
SAO: Síndrome de Alergia Oral
TAB: Test de Activación de Basófilos
TCR: Del inglés "*T cell Receptor*"
TGF-β: Del inglés "*Transforming Growth Factor Beta*"
Th: Linfocitos T Colaboradores, Del inglés "*Helper*"
TNF: Del inglés "*Tumor Necrosis Factor*"
TLR: Del inglés "*Toll Like Receptor*"
Treg: Linfocitos T Reguladores / Respuesta reguladora



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

CERTIFICADOS	V
AGRADECIMIENTOS	XV
ABREVIATURAS	XIX
ÍNDICE	23
ÍNDICE DE TABLAS	29
ÍNDICE DE FIGURAS	33
RESUMEN	37
INTRODUCCIÓN	41
1. Alergia a alimentos.....	43
1.1 Definición.....	43
1.2 Clasificación	43
1.2.1 Reacciones Tipo I o de hipersensibilidad inmediata.....	44
1.2.2 Reacciones Tipo II o por anticuerpos citolíticos o citotóxicos.....	45
1.2.3 Reacciones Tipo III inducidas por inmunocomplejos.....	46
1.2.4 Reacciones Tipo IV o retardadas.....	47
1.3 Epidemiología	48
1.4 Factores de riesgo.....	48
1.5 Clínica	49
1.5.1 Síntomas cutáneos.....	49
1.5.2 Síntomas respiratorios	49
1.5.3 Síntomas gastrointestinales	50
1.5.4 Síntomas de alergia oral.....	50
1.5.5 Afectación multiorgánica (Anafilaxia)	50
1.6 Fisiopatología.....	52
1.6.1 Mecanismo de reacción alérgica mediada por IgE.....	52
a) Fase de sensibilización	53
b) Fase efectora o desarrollo de respuesta alérgica	54
1.6.2 Respuestas de tolerancia.....	56
a) Células Treg naturales	56
b) Células Treg adaptativas.....	57
1.7 Historia natural.....	58
2. Alergia a alimentos de origen vegetal mediada por IgE	59
2.1 Proteínas alergénicas.....	59
2.1.1 Características físico-químicas.....	59
2.1.2 Panalérgenos.....	62
2.1.3 Alérgenos vegetales	63

a) Proteínas de reserva.....	63
b) Proteínas estructurales, catalíticas y reguladoras.....	63
c) Proteínas de defensa.....	64
2.2 Proteínas de transferencia de lípidos y síndrome LTP	64
2.2.1 LTP	64
2.2.2 Síndrome LTP	65
2.3 Pru p 3.....	66
2.4 Diagnóstico.....	67
2.5 Tratamiento	70
2.5.1 Evitación	70
2.5.2 Tratamiento sintomático	71
2.5.3 Tratamiento inmunomodulador	72
2.5.3.1 Mecanismos de la ITE	72
2.5.3.2 Fuentes alérgicas y vías de administración de la ITE	74
a) Inmunoterapia Subcutánea	75
b) Inmunoterapia Oral	75
c) Inmunoterapia Epicutánea	76
d) Inmunoterapia Sublingual	77
2.5.3.3 Nuevas estrategias para la ITE.....	79
a) Hipoalérgenos	79
b) Alérgenos recombinantes.....	80
c) ITE con péptidos.....	80
d) Adyuvantes inmunomoduladores.....	82
e) Sistemas multivalentes.....	83
2.6 Modelos experimentales en alergia alimentaria.....	85
2.6.1 Modelos murinos	86
JUSTIFICACIÓN	89
OBJETIVOS	93
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	97
CONCLUSIONES	107
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
ARTÍCULOS	129
Artículo 1: LPS promotes Th2 dependent sensitisation leading to anaphylaxis in a Pru p 3 mouse model.....	131
Artículo 2: Pru p 3-Epitope-based sublingual immunotherapy in a murine model for the treatment of peach allergy	133

Artículo 3: Glycosylated nanostructures in sublingual immunotherapy induce long-lasting tolerance in LTP allergy mouse model.....135



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE DE TABLAS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Tabla 1: Resumen de las citoquinas que intervienen en el desarrollo de la hipersensibilidad tipo I y su función.

Tabla 2: Clasificación fenotípica y funcional de las células Treg.

Tabla 3: Principales familias de proteínas de reserva que incluyen uno o más miembros descritos como alérgenos.

Tabla 4: Principales familias de proteínas estructurales, catalíticas o reguladoras que incluyen uno o más miembros descritos como alérgenos.

Tabla 5: Principales familias de proteínas de defensa que incluyen uno o más miembros descritos como alérgenos.

Tabla 6: Ventajas de la utilización de modelos animales para la alergia alimentaria.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE DE FIGURAS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Figura 1. Clasificación de las reacciones adversas a alimentos.

Figura 2. Reacciones de hipersensibilidad inmediata Tipo I. Iniciación y desarrollo.

Figura 3. Diferentes formas de lisis celular en las reacciones de Tipo II.

Figura 4. Reacciones de hipersensibilidad Tipo III. Formación de los inmunocomplejos.

Figura 5. Principales células implicadas en las reacciones de hipersensibilidad tipo IV.

Figura 6. Imágenes de pacientes con lesiones de angioedema y urticaria.

Figura 7. Patogénesis de la anafilaxia: mecanismos y desencadenantes, células, mediadores y órganos afectados.

Figura 8. Secuencia de acontecimientos de las reacciones alérgicas inmediatas: fase de sensibilización y desarrollo de la respuesta alérgica.

Figura 9. Cambio de isotipo a IgE.

Figura 10. Receptores implicados en el reconocimiento de proteínas alergénicas.

Figura 11. Esquema de alérgenos con epítomos lineales o conformacionales.

Figura 12. Secuencia de aminoácidos alineados de distintas LTPs (alimentos, látex y pólenes).

Figura 13. Modelo tridimensional de la LTP del melocotón, Pru p 3.

Figura 14. Esquema de elementos para el diagnóstico de la alergia a alimentos.

Figura 15. Técnica de prueba intraepidérmica y lectura del habón posterior.

Figura 16. Procedimiento para la obtención de muestras de suero y equipamiento ImmunoCAP System para la medición de los niveles de IgEe.

Figura 17. Representación de test de activación de basófilos.

Figura 18. Ejemplo de dispositivo de autoadministración de adrenalina y consejos de utilización en caso de sufrir un choque anafiláctico.

Figura 19. Representación del balance de células Th2 y Treg, y efectos por la ITE.

Figura 20. Posibles vías de administración de la inmunoterapia específica.

Figura 21. Representación de los mecanismos de la ITSL y sus efectos.

Figura 22. Representación de los mecanismos y células implicadas en la ITE con epítopos de células T.

Figura 23. Estructura de un dendrímero y de su unidad (dendrón).

Figura 24. Ratón de la cepa BALB/c, utilizada para desarrollar nuevas terapias para alergia alimentaria.

RESUMEN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

La alergia a alimentos es en la actualidad un problema de salud grave, ya que produce reacciones que pueden comprometer la vida del paciente. Su prevalencia va en aumento, llegando a afectar al 3-5% de la población adulta y al 5-8% de la población infantil. En el área mediterránea, el Prup3, perteneciente a la familia LTP (Lipid Transfer Protein), es el principal alérgeno del melocotón y provoca con frecuencia reacciones graves. Esto, junto con la alta tasa de sensibilización a LTP limita el desarrollo de estudios en humanos, aumentando la necesidad de desarrollar modelos animales para investigar los mecanismos inmunológicos involucrados y determinar la eficacia de nuevos enfoques de inmunoterapia para alérgenos alimentarios.

El primer objetivo de esta Tesis fue desarrollar un modelo de anafilaxia a melocotón, mediante la sensibilización de ratones con Prup3 en combinación con lipopolisacárido como adyuvante. La respuesta anafiláctica se demostró *in vivo* por una caída de temperatura corporal junto con la aparición de síntomas de anafilaxia e *in vitro* con niveles elevados de inmunoglobulinas tipo Th2 (IgE e IgG1) que concuerdan con los resultados observados en modelos de otros alérgenos. Estos ratones anafilácticos cuentan con un gran potencial para testar y desarrollar nuevas estrategias para tratar a pacientes alérgicos.

En la segunda parte de esta Tesis, nos centramos en probar dos aproximaciones terapéuticas con estructuras dendriméricas y péptidos de la proteína alergénica Prup3.

La primera aproximación consiste en un sistema dendrimérico que incluye péptidos de células T que administrado con un adyuvante (ODN-CpG) que se une al receptor TLR9 induce un cambio específico hacia una respuesta inmune Th1/Treg. La evaluación de las respuestas *in vivo* e *in vitro* obtenidas sugieren que la protección ofrecida por esta inmunoterapia específica se produce por una disminución en la respuesta efectora de Th2 con una reducción de IgE e IgG1 específicas de Prup3, una disminución en la respuesta proliferativa de células T CD4 específicas y en la producción de IL-4, un aumento simultáneo de células Treg y la producción de IFN- γ e IL-10.

La segunda aproximación incluye moléculas de manosas capaces de unirse a receptores de lectina de tipo C que pueden mejorar la captación y presentación de diferentes compuestos que modulan la respuesta inmunológica. Por ello, hemos reunido estos elementos para crear un nuevo enfoque de inmunoterapia sublingual, en el que uno o cuatro péptidos de Prup3 se combinan con dendrones de manosa. Como resultado vemos que este glicodendropéptido en su forma monovalente induce tolerancia frente al Prup3, asociada con una disminución de la respuesta Th2 (IgE, IgG1 e IL-4) y un patrón Th1/Treg incrementado (IFN- γ e IL-10). Además, induce protección a largo plazo durante al menos cinco semanas después del tratamiento y sin la necesidad de mantener un contacto regular con el alérgeno.

Por lo tanto, representa un enfoque novedoso de inmunoterapia específica que no requiere adyuvantes adicionales y que, además, por su diseño molecular y ruta química para su composición la hacen altamente versátil y potencialmente adaptable a otros tipos de alérgenos.

INTRODUCCIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. ALERGIA A ALIMENTOS

1.1 . Definición

Se define como reacción adversa a un alimento cualquier reacción anómala producida por la ingesta de un alimento. Los mecanismos por los que se produce pueden ser variados clasificándose en tóxicas o no tóxicas. Entre las reacciones no tóxicas se encuentran las intolerancias alimentarias, que se definen como reacciones mediadas por mecanismos no inmunológicos y que incluyen mecanismos enzimáticos, metabólicos o farmacológicos e indeterminadas [1] (Figura 1). Este tipo de reacciones presentan una alta morbilidad, elevados costes al sistema sanitario y pueden llegar a ocasionar reacciones graves que incluso conducen a la muerte [2]. También se incluyen las reacciones alérgicas que están mediadas por mecanismos inmunológicos.

El término alergia fue acuñado en 1906 por el doctor Clemens Von Pirquet, para definir un tipo especial de respuesta inmunológica frente a sustancias que normalmente no inducen reacciones en la mayoría de las personas. El origen de una reacción alérgica no está por tanto en el agente que la produce, sino en el propio individuo [3]. El término **alergia alimentaria (AA)** fue definido por el Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas como un efecto adverso para la salud a partir de una respuesta inmune específica que ocurre de forma reproducible tras la exposición a un alimento dado. Esta respuesta comprende todos los tipos de reacciones mediadas por mecanismo inmunológico, tanto las causadas por la inmunidad adaptativa como las causadas por el sistema inmune innato. A su vez, los alérgenos alimentarios se definen como los componentes de los alimentos (normalmente proteínas, pero a veces también haptenos químicos) que son reconocidos por el sistema inmune y provocan reacciones específicas, dando como resultado síntomas característicos [1].

1.2 . Clasificación

La función principal del sistema inmunológico es la de proteger al organismo frente a sustancias extrañas mediante mecanismos de defensa efectores que atacan y destruyen estos agentes. Este ataque produce generalmente efectos beneficiosos, pero hay casos en los que esta respuesta produce daños en los tejidos ya sea mediante la formación de anticuerpos específicos, linfocitos sensibilizados o ambos [4] frente a sustancias que en otros individuos no inducen ningún tipo de reacción. A esto es lo que se denomina reacción alérgica. Esta lesión tisular puede producirse, principalmente, en situaciones que difieren en el origen del antígeno, en el mecanismo implicado, así como en las manifestaciones que inducen. Teniendo en cuenta estas diferencias, Gell y Coombs

establecieron ya en los años 60 una clasificación de las reacciones de hipersensibilidad en cuatro tipos, utilizando como criterios el mecanismo efector que la desencadena [5]. Las reacciones de tipo I están asociadas con la formación de IgE contra alérgenos. En cuanto a las reacciones tipo II (mediadas por anticuerpos citotóxicos o citolíticos) o tipo III (inducidas por inmunocomplejos), se producen por una participación de IgG y/o IgM, aunque todavía no hay evidencias firmes. Mientras que las reacciones de tipo IV, que involucran células T, tienen un papel importante en trastornos como la enfermedad celiaca. Por otra parte, hay evidencia de que el sistema inmune innato, que incluye complemento, receptores tipo Toll y células inmunes innatas tales como neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, células NK, también participan en reacciones inmunes contra ciertos componentes de alimentos [6].

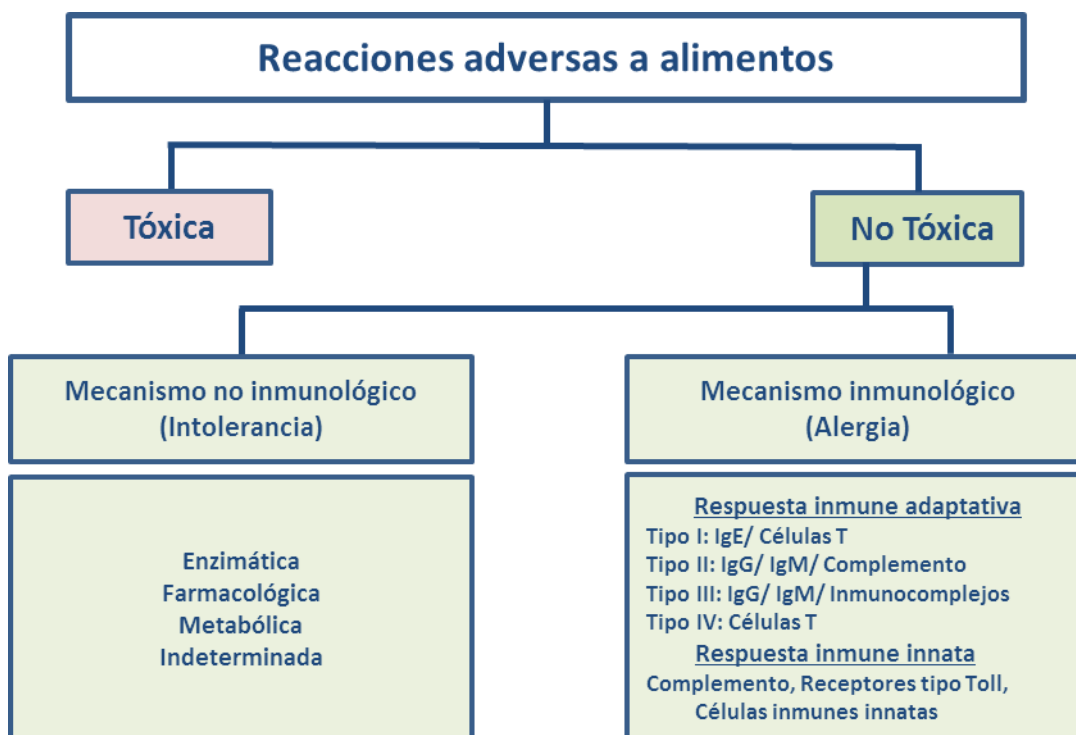


Figura 1. Clasificación de las reacciones adversas a alimentos.

1.2.1. Reacciones Tipo I o de hipersensibilidad inmediata

Son las formas más comunes de reacciones alérgicas a alimentos y se caracterizan por el desarrollo de IgE contra los alérgenos alimentarios y por la aparición de los síntomas inmediatamente después de la exposición del individuo con el antígeno responsable. Esta reacción puede acompañarse de inflamación, inducida por componentes celulares fundamentalmente mastocitos y basófilos, y estar mediada por células T y eosinófilos. En esta reacción se produce la liberación de

mediadores inflamatorios como histamina, leucotrienos y triptasa, que son los responsables de las manifestaciones clínicas. Los síntomas se localizan fundamentalmente en la piel, pero también puede localizarse en vías respiratorias o aparato digestivo, o bien ser generalizada, como ocurre en la anafilaxia, reacción que puede comprometer la vida del paciente, provocando la muerte.

Los pacientes con alergia alimentaria mediada por IgE pueden ser identificados mediante la detección de IgEe (Inmunoglobulina E específica) en suero y evaluando las respuestas tanto celulares como *in vivo* mediadas por IgE [7]. Este tipo de reacciones son objeto de esta tesis y su mecanismo será desarrollado a lo largo de la misma.

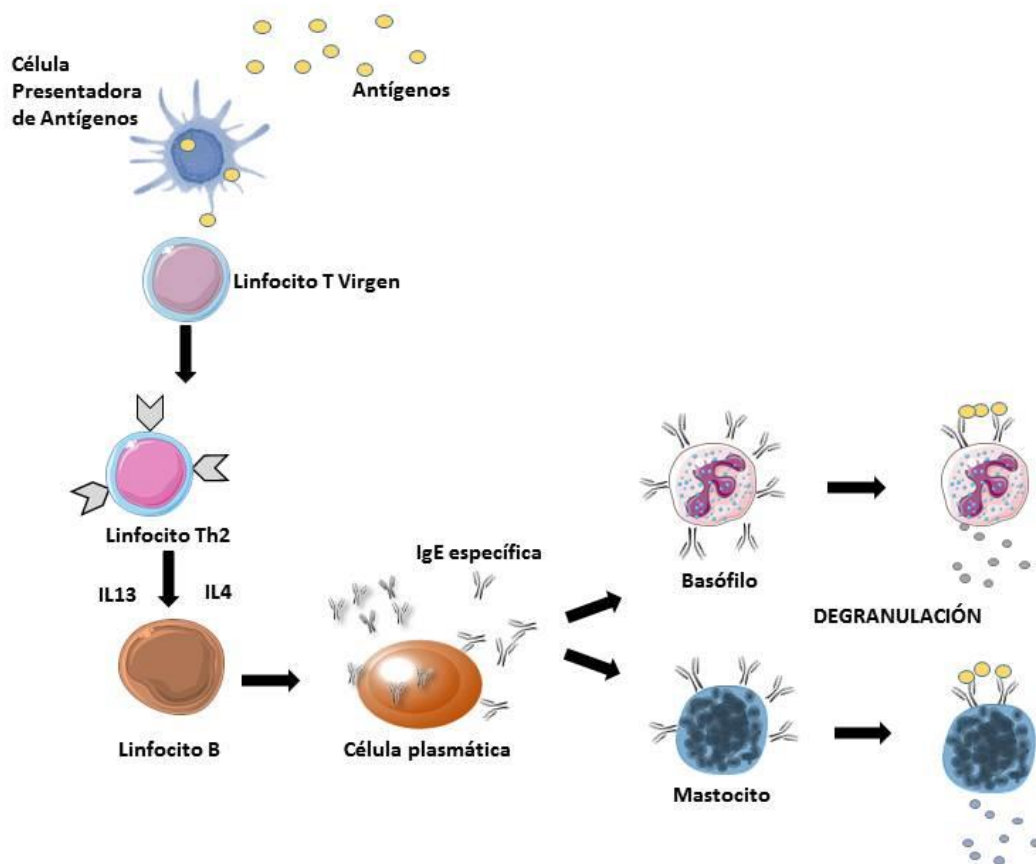


Figura 2. Reacciones de hipersensibilidad inmediata Tipo I. Iniciación y desarrollo.

1.2.2. Reacciones Tipo II o por anticuerpos citolíticos/citotóxicos

Este tipo de reacción ocasiona la destrucción de las células infectadas mediante lisis o por mediadores tóxicos. En estas reacciones, los antígenos se fijan a la membrana plasmática de eritrocitos, neutrófilos, plaquetas y células epiteliales de glándulas y mucosas (Figura 3). Posteriormente, los anticuerpos circulantes, fundamentalmente IgG e IgM y, en menor medida, IgA cubren las células y éstas activarán la vía clásica del complemento o se unirán a los receptores Fc de fagocitos y células “natural killer” (NK). Las manifestaciones clínicas más habituales son la

anemia hemolítica inmune, la trombopenia, o la granulocitopenia. Este tipo de reacciones no son frecuentes en AA, en cambio sí pueden darse en pacientes con alergia a fármacos.

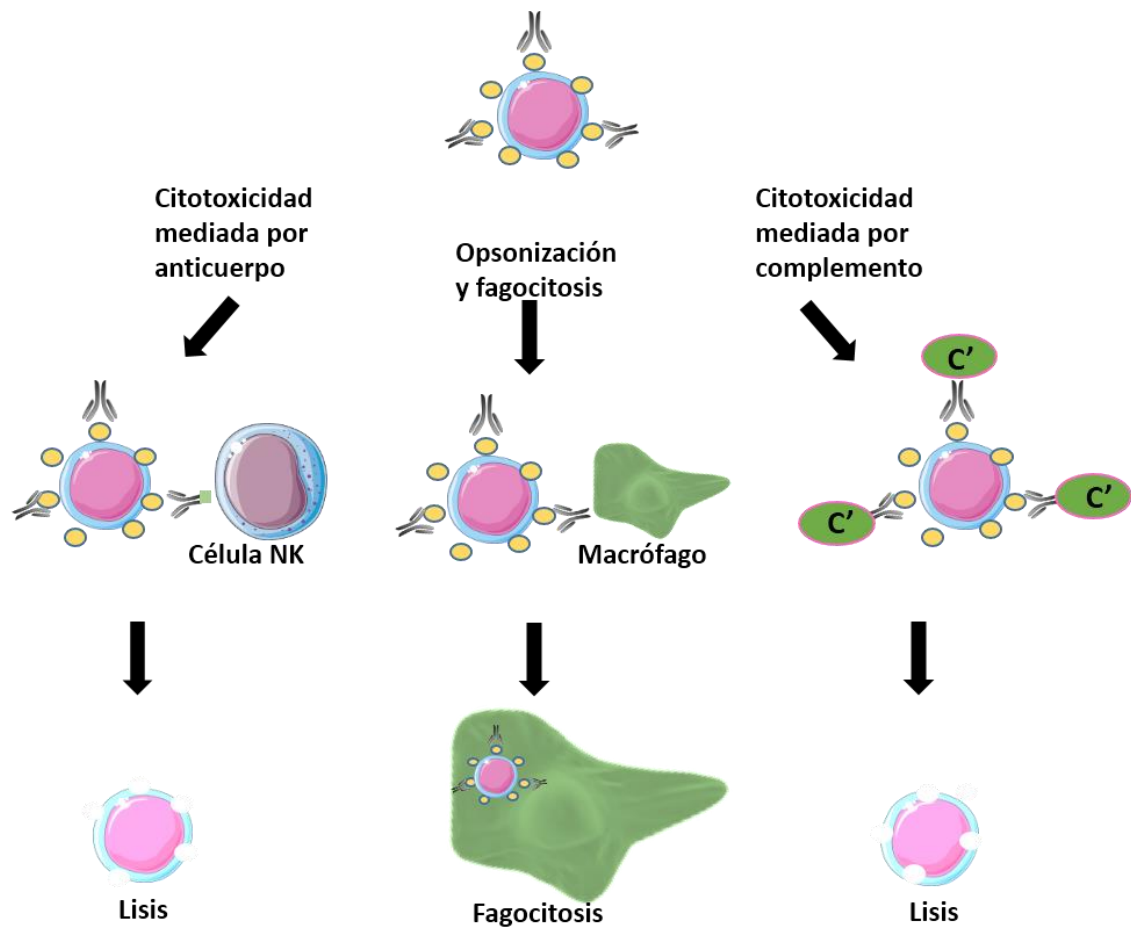


Figura 3. Diferentes formas de lisis celular en las reacciones de Tipo II.

1.2.3. Reacciones Tipo III inducidas por inmunocomplejos

La interacción de antígenos con sus anticuerpos circulantes específicos produce la formación de complejos antígeno-anticuerpo (Figura 4). Normalmente estos complejos son aclarados de forma eficaz por los monocitos del sistema mononuclear fagocítico, pero cuando hay cantidades excesivas de antígenos solubles (IgG e IgM), la retirada de estos inmunocomplejos puede ser ineficaz y su acumulación puede llevar a una reacción de hipersensibilidad, ya que estos se depositan en el endotelio de vasos sanguíneos, causando un daño secundario a las células. Los complejos inmunes depositados en los tejidos afectados pueden activar el complemento o interactuar directamente con basófilos y plaquetas. Los síntomas clínicos dependen del órgano diana en el que se depositan, fundamentalmente, riñones, pulmones, articulaciones y piel.

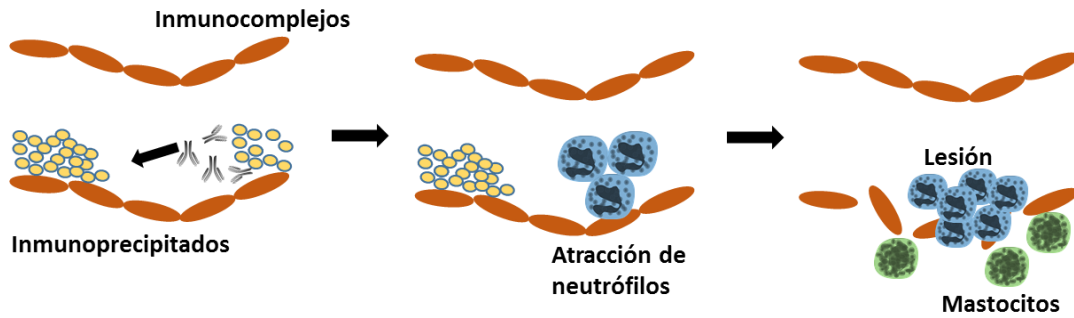


Figura 4. Reacciones de hipersensibilidad Tipo III. Formación de los inmunocomplejos.

1.2.4. Reacciones Tipo IV o retardadas

Este tipo de reacciones suelen producirse a partir de las 24-48 horas tras la exposición al antígeno y no están mediadas por anticuerpos, sino que el antígeno es captado por CPA y después presentado a las células T que actúan como células efectoras (Figura 5). El contacto entre el antígeno y las células T hace que estas células proliferen y liberen mediadores entre los que se encuentran las quimioquinas que atraen linfocitos T de memoria específicos, a los que ya se les había presentado el antígeno en el proceso de sensibilización. Una vez en el tejido, estas células liberan mediadores proinflamatorios y otras citoquinas específicas que atraen hacia el tejido a monocitos, macrófagos y otros tipos celulares que son los encargados de dar lugar a la respuesta inflamatoria. Aunque este mecanismo está más frecuentemente implicado en reacciones de alergia a fármacos, con respecto a los alimentos, se asocia a trastornos como la enfermedad celíaca y la enterocolitis inducida por proteínas alimentarias.

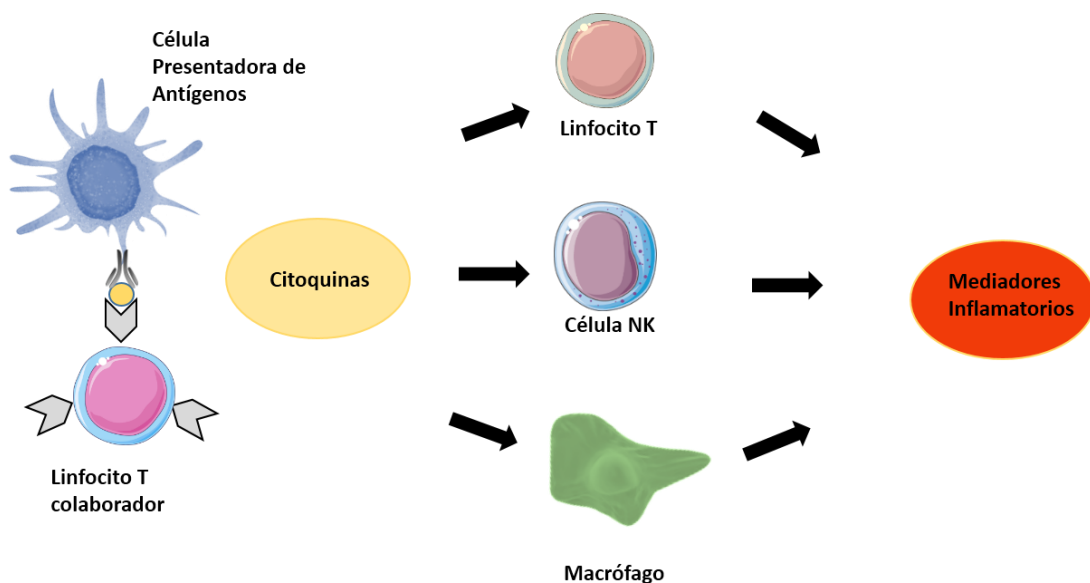


Figura 5. Principales células implicadas en las reacciones de hipersensibilidad tipo IV.

1.3 . Epidemiología

La primera vez que se publicaron datos de una reacción anafiláctica debida a la ingesta de alimentos, fue en 1988 [8], sin embargo determinar la prevalencia real de la AA ha supuesto todo un reto. Las dificultades que nos encontramos para ello son las diferencias en los diseños y tipo de estudios así como la propia definición de AA en cada uno de ellos [1]. El uso de biomarcadores para el diagnóstico, en combinación con la medición de la IgEe de alérgenos, ha proporcionado una evidencia consistente de que nos encontramos ante un aumento de la prevalencia de AA, al menos en países occidentales [9], considerándose en la actualidad un importante problema de salud pública. La AA afecta al 5-8% de los niños y al 3-5% de los adultos [2, 7, 10], cifras que están aumentando constantemente. Se estima que cada año entre 4-5 de cada 100.000 habitantes sufren una reacción anafiláctica grave [11].

En América y Europa, los alimentos son la principal causa de anafilaxia, ocasionando unas 30.000 reacciones anuales [12]. Leche, huevo, trigo, cacahuete, nuez, sésamo, pescado, frutas y verduras son algunos de los inductores más comunes de la AA asociada a IgE [7]. Según un estudio realizado en España en el 2015, los alimentos de origen vegetal son el principal motivo de consulta en las unidades de AA, observándose un incremento comparado con los análisis que se realizaron en 2005 (11.4% vs 7.4%) [13]. Dentro de los vegetales, las frutas frescas son la causa más frecuente (44.7%), en pacientes mayores de 5 años, seguido de los frutos secos (28.4%). De entre las frutas, la familia Rosácea, es la que con mayor frecuencia se ha descrito como responsable de AA de origen vegetal, induciendo hasta el 59.4% de los casos. Dentro de esta familia, el melocotón es la principal fruta implicada en la AA en España, Italia y Portugal, siendo el Pru p 3 su alérgeno mayor y el sensibilizante inmunodominante. En un estudio llevado a cabo por Pascal y cols en 2012 [14] se comprobó que hasta un 75.6% de pacientes que referían alergia a melocotón estaban sensibilizados a Pru p 3.

1.4 . Factores de riesgo

Entre los factores que pueden influir en desarrollar AA se incluyen el género, la edad, la etnia, la genética, la atopia, la insuficiencia de vitamina D, el aumento de grasa en la dieta, la reducción del consumo de antioxidantes, el aumento del uso de antiácidos, la obesidad [15], el aumento en la higiene y el tiempo-vía de exposición a los alimentos [16]. Algunos de estos factores podrían proporcionar oportunidades de prevención o tratamiento. Además existen factores que están asociados al riesgo de presentar reacciones graves como: la presencia de asma mal controlada, el

desconocimiento del paciente de haber ingerido un alimento al que era alérgico, el desarrollo de sintomatología en menos de 2 horas y el consumo de frutos secos [17]. Además de los descritos también se han identificado otros factores con el desarrollo de anafilaxia o la muerte, como son el tipo de alimento, el ejercicio, las infecciones virales, la menstruación, el estrés emocional, el consumo de alcohol y el retraso en el uso o la falta de acceso a un autoinyector de epinefrina [17, 18].

1.5 . Clínica

Las reacciones de AA mediadas por IgE se producen dentro de las dos primeras horas tras la ingesta y pueden incluir uno o más síntomas. Los síntomas son debidos a la afectación en la piel, el tracto respiratorio, gastrointestinal, y el sistema cardiovascular [19].

1.5.1. Síntomas cutáneos

Los síntomas cutáneos son los más frecuentes, apareciendo en más del 80% de las reacciones por AA tanto en niños como en adultos [20]. La urticaria aguda, junto al al angioedema (Figura 6), son los síntomas más comunes [1], por el contrario, la AA no es una causa probable de urticaria crónica [21].



Figura 6. Imágenes de pacientes con lesiones de angioedema (izquierda) y urticaria (derecha).

1.5.2. Síntomas respiratorios

Cabe destacar que los síntomas respiratorios crónicos aislados (por ejemplo, asma y rinitis) no suelen atribuirse a la AA [22]. Los síntomas respiratorios se observan con frecuencia y aunque por lo general suelen ser síntomas leves como (prurito nasal, estornudos o rinorrea), en ocasiones

pueden suponer un riesgo vital. Síntomas como el laringoespasma, el angioedema de orofaringe o el broncoespasmo con disnea deben poner en alerta ante la posibilidad de una reacción sistémica.

1.5.3. Síntomas gastrointestinales

Los síntomas gastrointestinales cubren un amplio espectro de manifestaciones que pueden abarcar el tracto digestivo en toda su extensión, por lo que pueden variar e incluir síntomas tanto inespecíficos y potencialmente graves por el riesgo de deshidratación como dolor abdominal tipo calambre, náuseas, vómitos, diarrea, flatulencias, reflujo gastroesofágico [23], e incluso rechazo del alimento en lactantes o niños pequeños. Estos síntomas son frecuentes en las enteropatías por proteínas que no son reacciones mediadas por IgE.

1.5.4. Síntomas de alergia oral (SAO)

Se trata de una serie de síntomas de rápida instauración que pueden presentarse como prurito orofaríngeo acompañado o no de lesiones de urticaria peribucal, angioedema de labios, e incluso picor en el cuello con eritema local, u ótico [24]. Los síntomas son de rápida aparición y corta duración.

Al tratarse de un conjunto de síntomas se considera un síndrome y fue descrito por primera vez por Tuft y cols. hace más de 70 años para referirse a la alergia mediada por IgE debida a la reacción cruzada de proteínas homólogas que comparten el polen y los alimentos (panalérgenos) [25]. También se observa en sujetos sin polinosis asociada, generalmente del sur de Europa, debido a alérgenos estables como las LTP (del inglés, "*Lipid Transfer Protein*") [26].

Por lo general, el SAO es considerado una forma leve de alergia alimentaria. Es el cuadro clínico más frecuente de AA en adultos, ocurriendo en más del 50% de los pacientes que refieren síntomas tras la ingesta de vegetales y frutas frescas [27].

1.5.5. Afectación multiorgánica (Anafilaxia)

La anafilaxia se define como una "reacción de alergia generalizada o sistémica grave, que amenaza la vida" [28]. La afectación resulta de la activación celular y de la generación y liberación masiva de mediadores inflamatorios como histamina y triptasa entre otros [29], existiendo la posibilidad de reacciones "bifásicas", en las que los síntomas recurren tras su aparente resolución, en un plazo de 4-72 horas [30]. Como se ha mencionado anteriormente, la piel es el órgano diana de una reacción de AA, sin embargo además de la piel, en una reacción anafiláctica, se produce afectación a otros niveles, siendo el aparato digestivo, el respiratorio y el cardiovascular los más frecuentemente implicados.

Dada la afectación multiorgánica, rápida, y la incapacidad para predecir los órganos afectados o su orden de aparición, en el diagnóstico diferencial de la anafilaxia deben usarse los algoritmos existentes para diferenciar de otras patologías y poder así tratar al paciente de forma temprana y adecuada [31].

La anafilaxia generalmente se produce a través de un mecanismo que implica el puenteo de IgE y la agregación de receptores de alta afinidad en mastocitos y basófilos. Otros mecanismos inmunológicos no mediados por IgE están implicados con menos frecuencia y entre ellos se incluyen los mediados por complejos de antígenos con IgG, por la activación del sistema del complemento y por la activación del sistema de coagulación. También hay desencadenantes no inmunológicos, que incluyen ejercicio, aire frío y algunos medicamentos como los opioides [32] (Figura 7).

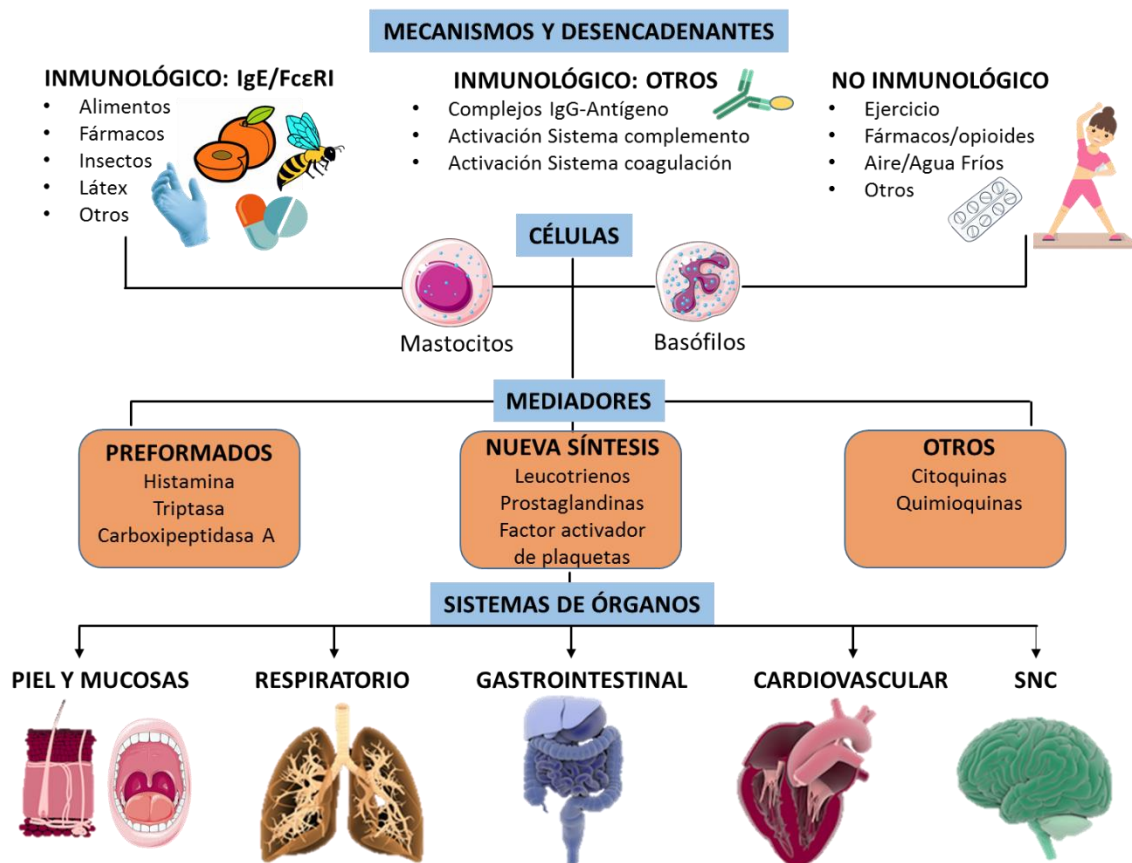


Figura 7: Patogénesis de la anafilaxia: mecanismos y desencadenantes, células, mediadores y sistemas de órganos afectados.

El diagnóstico erróneo, el tratamiento tardío, junto con determinados factores de riesgo como son la ingesta inadvertida del alérgeno o el asma mal controlada pueden influir en la aparición de un desenlace fatal [17]. El espectro de alimentos comúnmente responsables de causar reacciones anafilácticas varía según los países, siendo los más implicados el pescado, leche, huevo, frutas,

semillas, cereales o granos. Entre los factores que pueden influir para que dichos alimentos sean los principales responsables, destacan su amplia utilización en múltiples alimentos procesados e incorrectamente etiquetados, así como su elevada potencia alérgica [26, 33, 34].

1.6 . Fisiopatología

1.6.1. Mecanismo de reacción alérgica mediada por IgE

Para que se desarrolle una reacción alérgica, son necesarios varios pasos y se requiere de repetidas exposiciones a un determinado antígeno. El contacto de alérgenos a través del tracto gastrointestinal, tracto respiratorio o a través de la piel induce la producción de IgE (Fase de sensibilización) en individuos genéticamente predispuestos. Tras una nueva exposición, los anticuerpos IgE mediarán en el desarrollo de una respuesta alérgica inmediata (Fase efectora). Así mismo, es importante tener en cuenta que el proceso inflamatorio inducido durante la fase efectora consta a su vez de dos etapas: una inmediata (a los 30-60 minutos de la exposición al alérgeno) y una tardía (a las 24-72 horas de la exposición original) (Figura 8).

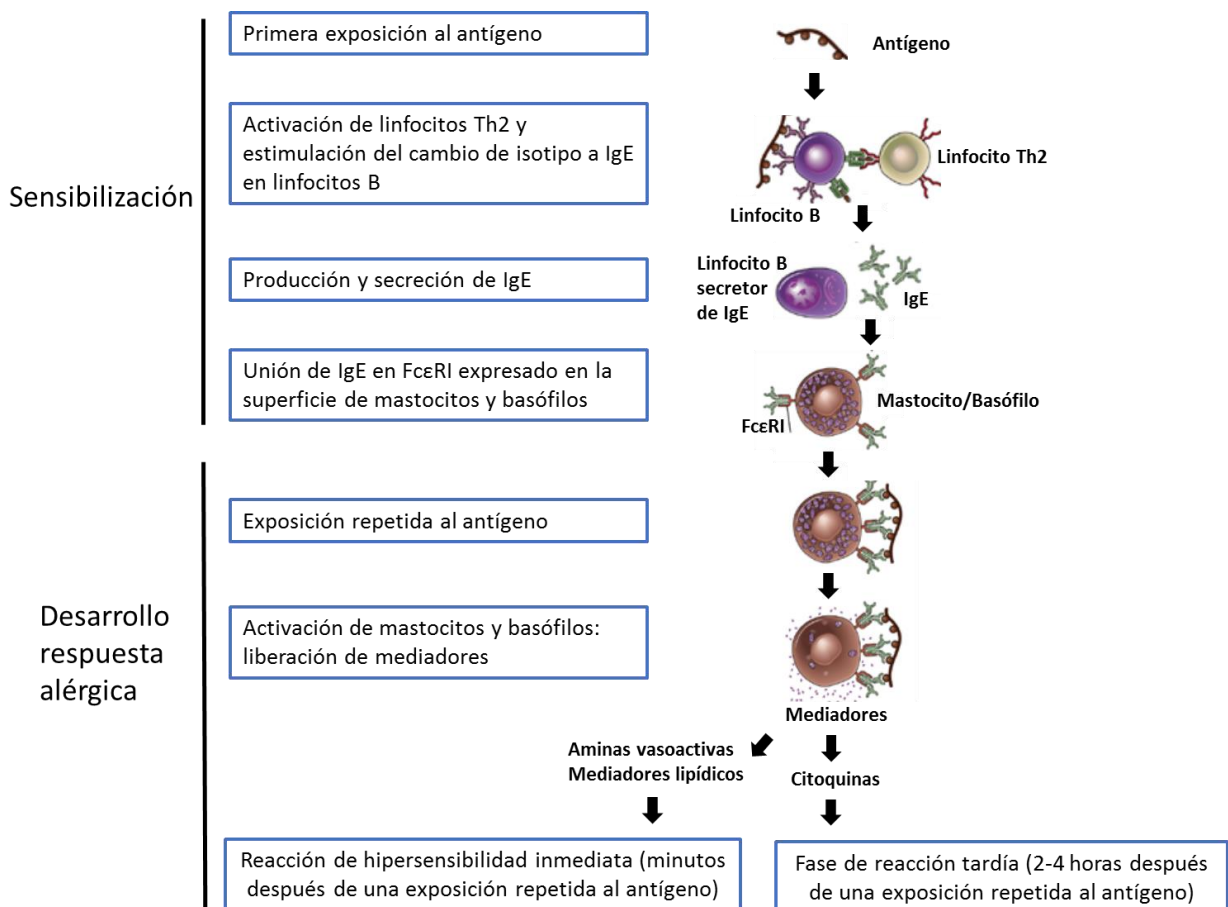


Figura 8: Secuencia de acontecimientos de las reacciones alérgicas inmediatas: fase de sensibilización y desarrollo de la respuesta alérgica. Imagen tomada de Abbas *et al.* En: *Cellular and Molecular Immunology*, 7th Ed, 2012 (Abbas *et al.*, 2012).

a) Fase de sensibilización

La entrada en el organismo de un antígeno pone en marcha un proceso silencioso de sensibilización. Algunos estudios sitúan a las células dendríticas (CD) como las CPA profesionales, capaces de captar, procesar y presentar el antígeno y así iniciar y dirigir la respuesta inmune [35]. A nivel gastrointestinal, las CD se encuentran presentes en la lámina propia, placas de Peyer, ganglios mesentéricos e intercaladas entre las células del epitelio intestinal, enviando prolongaciones a la luz intestinal para rastrear el paso de antígenos. Una vez las CD capturan dichos antígenos en la periferia, los procesan y los transportan a los ganglios linfáticos para su posterior presentación como péptidos en el entorno específico de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés “*Major Histocompatibility Complex*”) a los linfocitos T vírgenes. Estos linfocitos, dependiendo de diferentes señales (moléculas coestimuladoras, citoquinas, quimioquinas,...), se pueden diferenciar en distintas subpoblaciones efectoras Th1, Th2, Th9 o Th17, que se caracterizan a su vez por el perfil de citoquinas que producen, y van a estar implicadas en diferentes respuestas inflamatorias [36]. Dentro de dichas subpoblaciones, la Th2 ha sido clásicamente descrita como la principal población responsable en la respuesta alérgica, ya que estimula la síntesis de IgE, sobre todo mediante la secreción de IL-4 e IL-13 [37]. En este contexto, las CD expresan gran cantidad de moléculas coestimuladoras CD80/86 y pueden liberar IL-4, promocionando así una respuesta Th2.

Estos linfocitos Th2 activan a su vez a los linfocitos B específicos, que durante una respuesta alérgica pueden expresar diferentes isotipos de Ig, lo que permite tener anticuerpos con la misma especificidad, pero con diferente función efectora. Para que los linfocitos B experimenten el cambio de isotipo de cadena pesada y sinteticen IgE son necesarias dos señales que se producen a través de una compleja serie de interacciones con el antígeno y con las células T específicas [38] (Figura 9). Una de las señales es dependiente de citoquinas producidas por linfocitos Th2 (principalmente IL-4) y tiene como resultado la activación de la transcripción de la cadena pesada ϵ de la IgE. La otra señal es dependiente de CD40, que es un receptor que se expresa de forma constitutiva sobre los linfocitos B y que induce la recombinación del ADN para la región de la cadena pesada ϵ [39] y la expresión de IgE. De este modo, se genera un gran número de anticuerpos IgE que difunden a la circulación sanguínea.

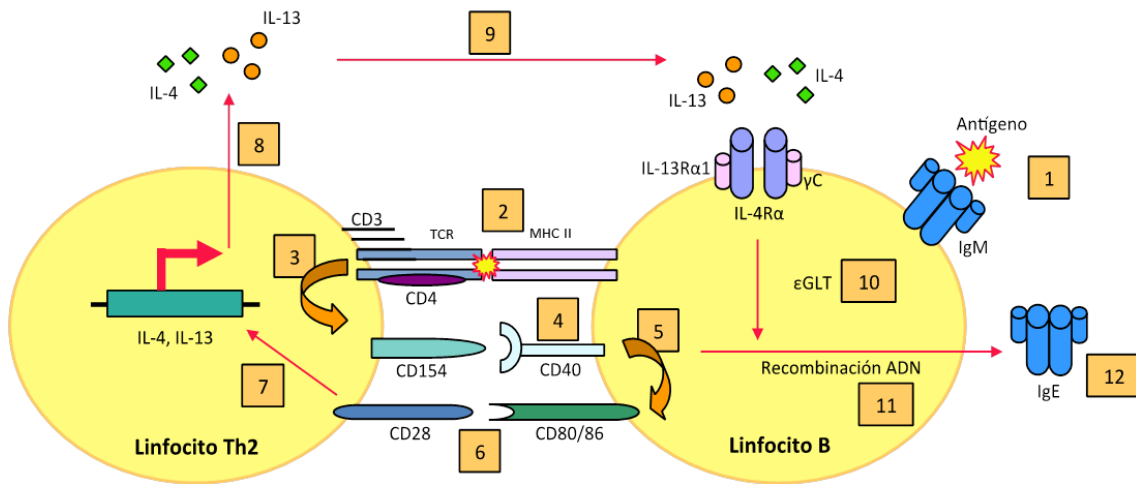


Figura 9: Cambio de isotipo a IgE. Una célula B que expresa IgM específica para el antígeno se une a éste por medio de las Ig de su superficie celular (1), lo procesa y lo presenta a una célula Th2 específica de ese antígeno (2). La formación del complejo tri-molecular TCR-antígeno-MHC de clase II induce una expresión rápida en los linfocitos T de CD154 (3), que es el ligando del receptor CD40 que se expresa constitutivamente sobre los linfocitos B (4). La interacción entre las células T y B mediadas por la vía CD40/CD154 (4) se amplifica por interacciones entre moléculas coestimuladoras, particularmente la pareja ligando/receptor CD28/CD80-CD86 (5). La unión de CD40 regula la expresión de CD80-CD86 sobre las células B (5). CD80-CD86 se une a CD28 (6) e induce la transcripción (7) y secreción (8) de IL-4 y/o IL-13, que se unirán a sus receptores heterodiméricos en los linfocitos B (9). En un mismo paso, la célula B recibe las dos señales necesarias para el cambio de isotipo a IgE: IL-4 dispara la transcripción de la cadena pesada ε (10) y la unión de CD40 con su ligando activa la recombinación de ADN para la región ε (11), provocando el cambio de isotipo a IgE y la secreción de anticuerpos IgE (12). Imagen tomada de Vercelli D, *Immunobiology of IgE*. En: *Middleton's Allergy*, 7th Ed, 2009 [38].

Como se ha comentado anteriormente, la IL-4 producida por las células Th2 es esencial para esta síntesis de IgE, mientras que la IL-5, la IL-13 y el GM-CSF (del inglés, “*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*”) favorecen la producción y la supervivencia de mastocitos y basófilos, los cuales unen IgE a través de sus receptores específicos de alta afinidad (FcεRI) [40, 41]. De este modo, los mastocitos y basófilos quedan sensibilizados frente al antígeno para el que tienen IgEe unida en su superficie.

b) Fase efectora o desarrollo de respuesta alérgica

Una vez producida la sensibilización, una exposición antigénica posterior inicia una respuesta inmune efectora por la unión entrecruzada del alérgeno a diferentes moléculas de IgEe unidas a su FcεRI. Este receptor lo expresan de forma constitutiva mastocitos y basófilos en su superficie[42]. En esta nueva exposición, el antígeno interacciona con dos o más moléculas de IgE adyacentes, fenómeno que se denomina “puenteo” y que desencadena la activación de mastocitos y basófilos. Los mastocitos derivan de células madre pluripotenciales presentes en la médula ósea (CD34⁺) y se distribuyen a través de todo el tejido conectivo. Generalmente se encuentran adyacentes a los

vasos sanguíneos y linfáticos, cerca o dentro de las terminaciones nerviosas y debajo de las superficies epiteliales que constituyen las puertas de entrada más importantes a los antígenos, la piel y los epitelios de los tractos gastrointestinal y respiratorio.

Los basófilos son granulocitos sanguíneos que presentan semejanzas estructurales y funcionales con los mastocitos. Al igual que éstos, derivan de células madre pluripotenciales de la médula ósea (CD34⁺) que se diferencian y maduran en la médula ósea y luego circulan en la sangre. En condiciones normales no residen en los tejidos periféricos, pero son capaces de infiltrar sitios donde ocurren procesos inflamatorios o inmunológicos. Al igual que los mastocitos almacenan mediadores preformados en sus gránulos citosólicos y expresan FcεRI, por lo que son capaces de fijar IgE y activarse por la unión del antígeno.

Tras esta activación, se producen cambios en la membrana celular de mastocitos y basófilos y se desencadena una serie de reacciones en cascada que finaliza con la degranulación y liberación del contenido de sus gránulos citosólicos de forma inmediata (histamina, triptasa, heparina o factores quimiotácticos) [43] y con la síntesis *de novo* y secreción de mediadores lipídicos (leucotrienos, prostaglandinas)[44] y otros mediadores pro-inflamatorios que pueden contribuir a la reacción alérgica (TNF-α, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, MIP-1α, MIP-1β, IL-3, GM-CSF) (Tabla 1) [45]. Todos estos mediadores liberados son los responsables de las manifestaciones clínicas características de estos procesos a nivel de piel y mucosas (nasal, bronquial, ocular y del tracto gastrointestinal). Su función será sostener el proceso inflamatorio en el tiempo a través de la vasodilatación, el aumento de la permeabilidad capilar, la contracción del músculo liso y la infiltración de eosinófilos y otras células inflamatorias que son atraídas específicamente al foco inflamatorio.

Mediador (es)	Función
IL-3	Estimula la proliferación de los mastocitos
IL-4, IL-13	Estimulan y amplifican la respuesta de células Th2
IL-3, IL-5 y GM-CSF	Estimulan la producción y la activación de los eosinófilos
TNF-α	Estimula la inflamación y la producción de citoquinas por muchos tipos celulares y activa el endotelio
MIP-1a	Quimiotaxis de los leucocitos

Tabla 1: Resumen de las citoquinas que intervienen en el desarrollo de la hipersensibilidad tipo I y su función.

1.6.2. Respuestas de Tolerancia

Las respuestas inmunológicas y sobre todo las que causan una reacción de inflamación deben tener un control que las limite, y para ello existen varios mecanismos entre los que se incluye la deleción o anergia de los clones de células T efectoras [46].

La respuesta de tolerancia se desarrolla cuando la interacción de CPA con linfocitos T da como resultado la producción de células T reguladoras específicas de antígeno (Treg) que suprimen activamente otras células efectoras que reaccionan frente a antígenos de alimentos [47]. Las células Treg son capaces de suprimir las respuestas efectoras en las reacciones alérgicas a través de diferentes mecanismos: (i) suprimiendo la degranulación de células efectoras inducida por el alérgeno específico [48], (ii) inhibiendo el reclutamiento de eosinófilos y otras células efectoras a los tejidos inflamados [49] y (iii) actuando sobre los linfocitos B para promover la producción de IgG4 e inhibir la producción de IgEe frente al alérgeno [50]. Las células Treg pueden interactuar con células residentes en tejidos para contribuir a su remodelación, y promover la generación de CD con fenotipo tolerogénico. Estas funciones se realizan a través de diferentes mecanismos de supresión, como pueden ser la producción de citoquinas inhibitoras (IL-10, TGF- β), citolisis (secreción de moléculas citotóxicas como granzimas), mecanismos de disrupción metabólica (CD25, AMPc y adenosina), y mecanismos que tienen a las CD como diana (CTLA-4, PD-1) [51, 52].

Un fallo o una pérdida en la tolerancia oral se hipotetiza como el principal problema en la AA [53], siendo la naturaleza de esta respuesta similar a la de cualquier respuesta inmunitaria. En los últimos años se ha podido comprobar el papel importante de las células Treg en la inducción de tolerancia oral [54]. Las células Treg son una población heterogénea de células T que se clasifican según sus características fenotípicas y funcionales (Tabla 2):

- a) **Células Treg naturales.** Son células CD4⁺ y CD8⁺ que se producen en el timo y están programadas para ejercer la supresión sobre aquellas células T que reaccionan contra antígenos propios. Necesitan el contacto célula-célula para llevar a cabo la regulación de la respuesta autoinmune. Estas Treg fueron las primeras en ser identificadas debido a la expresión constitutiva de la cadena α del receptor IL-2 (IL-2R), denominado CD25 [55]. Sin embargo, las células T efectoras también pueden expresarlo. Por ello se diferenció a las células Treg en su análisis fenotípico, por su mayor intensidad en la expresión de CD25 (CD4⁺CD25^{high}) [56]. En los últimos años, la proteína FoxP3, un miembro de los factores de transcripción de la familia de proteínas *forkhead* las cuales juegan un papel importante en la regulación de la expresión de genes implicados en el crecimiento celular, proliferación, diferenciación y longevidad, se ha introducido como marcador importante de las células Treg naturales [57],

demostrándose la presencia de FoxP3 mayoritariamente en células CD4⁺CD25^{high}. Además, se ha observado que los sujetos que presentan una mutación en el gen que codifica para este factor de transcripción FoxP3 manifiestan una enteropatía grave en el contexto de AA y dermatitis atópica [58, 59].

Las células Treg naturales pueden diferenciarse a su vez en:

- Células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Su función es el control en órganos linfoides secundarios de las células T autorreactivas que escapan a la selección negativa, asegurando así la tolerancia periférica.
 - Células T natural killer (NKT). Subpoblación de células T que presentan propiedades de células NK, pero expresan el TCR α/β (una cadena α invariable unida a varias cadenas β). Las NKT secretan grandes cantidades de citoquinas tanto Th1, interferón gamma (IFN- γ) o TNF- α , (del inglés “*Tumor Necrosis Factor-alfa*”), como Th2, IL-4 e IL-13 [60] o TGF- β (del inglés “*Transforming Growth Factor Beta*”), relacionadas con enfermedades autoinmunes [61].
- b) Células Treg adaptativas.** Son células CD4⁺ que se desarrollan también en el timo, pero que adquieren su actividad supresora en la periferia. Su función es regular la respuesta contra antígenos propios y extraños, y para ello liberan al medio citoquinas supresoras de la actividad, como TGF- β [62] o IL-10 [63].

Estas células a su vez se dividen en [62, 63]:

- Células T colaboradoras tipo 3 (Tc3). Las cuales se inducen por la administración oral de un antígeno.
- Células T reguladoras 1 (Tr1). Las cuales se inducen por la administración de un antígeno en presencia de IL-10.

Tipo Treguladora	Origen	Fenotipo	Mecanismo de acción	Tipo de respuesta
Natural • CD4CD25Foxp3 • NKT	Timo	CD4 ⁺ o CD8 ⁺ CD25 ^{High} Foxp3 ⁺	Contacto célula-célula CTLA-4; TGF- β	Th1/Th2 (Principalmente Th1)
Adaptativa • Tr1 • NKT	Periferia	CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ ¿CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ ?	IL-10 TGF- β	Th1/Th2

Tabla 2. Clasificación fenotípica y funcional de las células Treg.

1.7. Historia natural

La historia natural de la AA se refiere tanto a la adquisición de sensibilización, como al cambio hacia una respuesta de tolerancia [64]. Frecuentemente la AA comienza en los primeros 2 años de vida, siendo común el desarrollo espontáneo de tolerancia, o una sensibilización asintomática que se manifiesta posteriormente. Cuando su origen se da en la edad adulta o adolescencia, es más probable que la evolución sea hacia la persistencia [65]. Las reacciones alérgicas por frutas y vegetales, generalmente son duraderas [64], sobre todo cuando se deben a reacciones asociadas al síndrome polen-alimentos, o al síndrome LTP, comenzando por el melocotón y la manzana [13, 26], y habitualmente aumentando el número de alimentos implicados con el tiempo. Como factores predictores de resolución se han descrito un menor tamaño de pruebas cutáneas, [66] así como el nivel de IgEe, o la proporción entre IgEe e IgG4e [67], en el momento de la reevaluación del paciente. Por ello, se recomienda reevaluar a los pacientes con AA periódicamente.

2. ALERGIA A ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL MEDIADA POR IgE

En la actualidad, la AA es un problema sanitario de una magnitud considerable en los países occidentales. El consumo en nuestra dieta diaria, unido a las características físico-químicas de sus componentes, hace que los alimentos de origen vegetal sean una de las causas más frecuentes de AA [68]. Además, con frecuencia las reacciones alérgicas inducidas por la ingesta de vegetales se asocian con reacciones sistémicas que pueden llegar a comprometer la vida de los pacientes [69], por ello es un área con gran interés de estudio en los últimos años.

De las distintas moléculas alergénicas que componen los diferentes alimentos, no todas son reconocidas con la misma frecuencia. En general, un paciente alérgico reacciona prioritariamente frente a determinados antígenos, bien porque son más abundantes o porque presentan mayor capacidad sensibilizante y/o alergénica. Se denominan alérgenos mayoritarios aquellos frente a los cuales presentan IgE más del 50% de los enfermos alérgicos.

2.1. Proteínas alergénicas

2.1.1. Características físico-químicas

En los últimos años se han definido características intrínsecas que podrían, ya sea por separado o colectivamente, estar implicadas en el condicionamiento de la alergenicidad de las proteínas. Algunas de las más relevantes son: la solubilidad, la estabilidad, el tamaño (no puede ser menor a 4-6 kDa) [92] y la conformación [70]. Estas características podrían verse afectadas por la inducción de nuevos epítopos generados por modificaciones postraduccionales, lo cual también juega un papel importante en el condicionamiento de la alergenicidad. Otras características a tener en cuenta son la resistencia a la degradación, la capacidad de unión o transporte de calcio, la similitud con otras proteínas [71], y los patrones de glicosilación [72]. En cuanto a esto último, hay que comentar que las glicoproteínas suelen producir cambios en la estabilidad, solubilidad, hidrofobicidad, y en la carga eléctrica de las proteínas, haciendo que los sitios glicosilados estén más expuestos al sistema inmune [71, 73].

En varios estudios se ha demostrado que muchos alérgenos de plantas son ricos en azúcares, como la manosa, que interactúan específicamente con receptores específicos en las CPA, por ejemplo, los receptores DC-Sign [74] (Figura 10). Este tipo de receptor (también conocido como CD209) es un receptor de lectina de tipo C, que está presente tanto en macrófagos como en CD de humanos. En las CD mieloides y pre-plasmacitoides, DC-SIGN media las interacciones de las CD con el endotelio y la activación de las células T CD4⁺, así como el reconocimiento de haptenos patógenos. Aunque el papel exacto de DC-SIGN en la patogénesis de las AA aún no se ha aclarado

completamente, se ha demostrado que la unión y la captación de antígenos glicosilados mediados por estos receptores son cruciales tanto para el proceso de sensibilización como para la respuesta inmune [75].

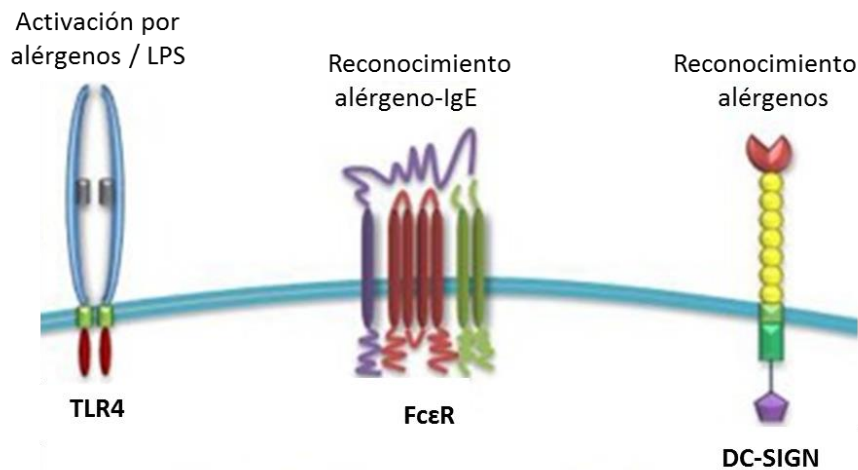


Figura 10. Receptores implicados en el reconocimiento de proteínas alergénicas.

En la superficie de las proteínas alergénicas existen regiones inmunodominantes, conocidas con el nombre de epítomos. Un mismo antígeno puede tener epítomos para unirse con anticuerpos, a través de fragmentos de unión al antígeno (Fab) o con receptores de células T. En general, los receptores de los linfocitos B reconocen la estructura expuesta, primaria o terciaria del antígeno nativo y los de las células T principalmente la primaria. Las células T necesitan que una CPA procese enzimáticamente al antígeno para que las porciones primarias se asocien a las moléculas del MHC. Por tanto, los receptores T solo pueden reconocer epítomos lineales (aminoácidos continuos y contiguos), ya que los conformacionales (secuencias de aminoácidos continuos o discontinuos y distantes, que se aproximan entre sí debido al plegamiento o conformación tridimensional del antígeno) se destruyen durante el procesamiento de la proteína [76, 77] (Figura 11). A pesar de la especificidad de la IgE, en ocasiones ésta puede reconocer otros antígenos incluso de alimentos no relacionados [78].

Se han descrito dos patrones distintos de sensibilización a alimentos:

- Vía digestiva, a través de glicoproteínas resistentes y estables al calor, acidez, y proteasas; que se consideran alérgenos completos, pues son capaces de sensibilizar y además de desencadenar una reacción alérgica [79].

- Vía respiratoria, a través de aeroalérgenos, que en su mayoría son glicoproteínas solubles, termolábiles y fáciles de degradar, incapaces de sensibilizar por vía digestiva [80].

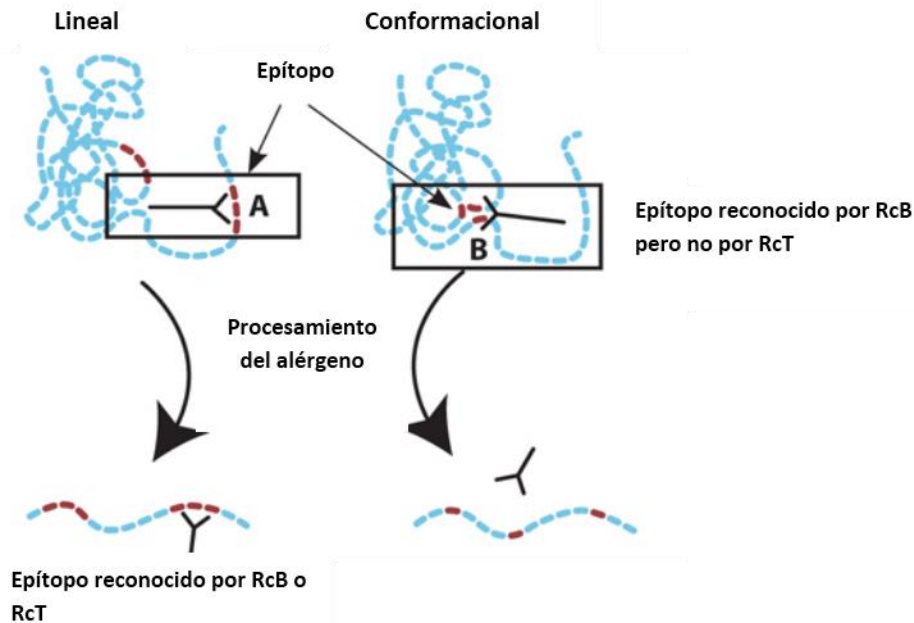


Figura 11: Esquema de alérgenos con epítopos lineales (izquierda) o conformacionales (derecha).

En el caso de las alergias a frutas, la estabilidad de los alérgenos implicados es crucial para la vía de sensibilización y la clínica del paciente. Por ejemplo, se ha demostrado que pacientes alérgicos al polen de olivo y sensibilizados a profilinas, desarrollaron SAO con múltiples frutos de familias taxonómicamente no relacionadas. En cambio, pacientes sin alergia a pólenes, pero sensibilizados a LTP no específicas, desarrollaron reacciones sistémicas al melocotón y la manzana. Esto es debido a que las profilinas son alérgenos lábiles presentes en el polen y los alimentos, y la sensibilización se produce a través de la vía respiratoria a los alérgenos del polen. Los anticuerpos IgE generados pueden provocar reacciones locales en la mucosa orofaríngea cuando se exponen a profilinas de frutas por reactividad cruzada. Por el contrario, las LTP son una familia de alérgenos estables que resisten el tratamiento térmico y la digestión enzimática, y pueden comportarse como verdaderos alérgenos alimentarios induciendo sensibilizaciones primarias (no relacionadas con el polen) y desencadenando reacciones sistémicas [81].

2.1.2. Panalérgenos

El concepto de panalérgeno abarca familias de proteínas no relacionadas taxonómicamente, que están involucradas en procesos vitales generales y, por lo tanto, ampliamente distribuidas en la naturaleza. Los panalérgenos conocidos actualmente comprenden solo unas pocas familias de proteínas, que incluyen profilinas, polcalcinas y proteínas de transferencia de lípidos no específicas. Aunque se originan a partir de organismos no relacionados, tales moléculas funcionalmente relacionadas comparten regiones de secuencias altamente conservadas (Figura 12) y estructuras tridimensionales y, por lo tanto, pueden cumplir los requisitos para el reconocimiento cruzado de IgE. Son responsables de muchas reacciones cruzadas de IgE incluso entre polen y fuentes de alérgenos se observa con mayor frecuencia en pacientes que muestran IgE de profilina [83]. Estos hallazgos pueden explicarse por una amplia reactividad cruzada de IgE entre panalérgenos de diferentes fuentes [84], pero también por la alergenicidad cruzada que subyace a la respuesta de las células T a regiones conservadas de panalérgenos [85]. Esta circunstancia es muy relevante en el tratamiento de pacientes con alergias múltiples y posiblemente para su desarrollo [86]. Aunque normalmente se consideran alérgenos menores, la sensibilización a panalérgenos podría ser problemática ya que conlleva el riesgo de desarrollar múltiples sensibilizaciones. Las manifestaciones clínicas parecen estar estrechamente relacionadas con factores geográficos y de exposición [87].

Foods	10	20	30	40	50	60	70	80	90	%id.
Pru p 3	-ITCGQ	-VSSALAPCIPIYVRGGAVPA	--CCNGIRNVNLRARTTPDRQAACNCLKQLSASVPGVNPNNAAALPGK	--CGVSIPIYKISASTNCATVK	--					
Mal d 3	-ITCGQ	-VTSSLAPCIPIYVRGGAVPA	--CCNGIRNVNLRARTTPDRQAACNCLKQLSASVPGVNPNNAAALPGK	--CGVSIPIYKISASTNCATVK	80					
Pru ar 3	-ITCGQ	-VSSSLAPCIPIYVRGGAVPA	--CCNGIRNVNLRARTTPDRQAACNCLKQLSASVPGVNPNNAAALPGK	--CGVSIPIYKISASTNCATVK	91					
Pru av 3	-ITCGQ	-VSSNLAAPCIPIYVRGGAVPA	--CCNGIRNVNLRARTTPDRQAACNCLKQLSASVPGVNPNNAAALPGK	--CGVSIPIYKISASTNCATVK	88					
Pru d 3	-ITCGQ	-VSSNLAAPCIPIYVRGGAVPA	--CCNGIRNVNLRARTTPDRQAACNCLKQLSASVPGVNPNNAAALPGK	--CGVSIPIYKISASTNCATVK	95					
Vit v 1	TVTCGQ	-VASALSPCISYLKQCGAVPAG	--CCSGIKSLNSAAKTTEDRQAACNCLKQLSASVPGVNPNNAAALPGK	--CGVSIPIYKISASTNCATVK	61					
Cor a 8	SLTCGQ	-IKGNLTPCVLYLKNQGVLPSP	--CCGKVRVAVNDASRTTSDRQAACNCLKQLSASVPGVNPNNAAALPGK	--CGVSIPIYKISASTNCATVK	59					
Zea m 14	ATSCGQ	-VASAIAPCISYARCGCGSAG	--CCSIVRSLNNAARTTADRQAACNCLKQLSASVPGVNPNNAAALPGK	--CGVSIPIYKISASTNCATVK	63					
Hor v LTP1	-LNCGQ	-VDSKMKPCLTYVQGGPGPSGE	--CCNGVRLDHNQAQSSGDRQVTCNCLKGIARGIHNLLNNAASTPSK	--CGVSIPIYKISASTNCATVK	44					
Dau c LTP	-LTCGQ	-VTGALAPCLGYLRSQVNVVPLT	--CCNVVRLNNAARTTADRQAACNCLKQLSASVPGVNPNNAAALPGK	--CGVSIPIYKISASTNCATVK	55					
Cas s 8	STTCGQ	-VSKSLMPCLTYLKNQGVLPSP	--CCGKVRVAVNDASRTTSDRQAACNCLKQLSASVPGVNPNNAAALPGK	--CGVSIPIYKISASTNCATVK	46					
Asp o 1.01	-ITCGA	-DSKITG-EGVSYVMGKGPL*			43					
Asp o 1.02	-ISCGQ	-ATSMIS-PQVNVARG*			50					
Lac s 1	ATSCGQ	-VTANLA*			64					
Latex										
Hev b 12	-ITCGQ	-VQSALVPCISYLKKTTEPTPAT	--CCNGVRTINNAKTTADRQAACNCLKQLSASVPGVNPNNAAALPGK	--CGVSIPIYKISASTNCATVK	65					
Pollens										
Par j 1	QETCGT	-MVRALMPCLPFFVQGGKEKESKG	--CCSCAKRLDGETKTPGQVHACBCHQTAMKTYSDIDGKLVSEVPEKH	--CGIVDSKLPPIIDVIMDCCKT	28					
Par j 2	EEACCK	-VVDIMPCLHFVKGEEKESKE	--CCSCTKKLSEVKTTEQKREACKIVRATKIGISGINKBLVVEVPEKH	--CDIKTTLPPITADPDCSKI	27					
Ara t LTP	ALSCGS	-VNSNLAACIGYVLRQGVVIPA	--CCSGVKNLNSIKTTEDRQAACNCLKQLSASVPGVNPNNAAALPGK	--CGVSIPIYKISASTNCATVK	53					
Art v 3	ALTCSD	-VSNKISPCISYLKQCGEVPAD	--CCAGVKGLND*		40					
Ole e 7	APSQST	-VTALLTSCVSYIDDQ*			19					

Figura 12. Secuencia de aminoácidos alineados de distintas LTPs (alimentos, látex y pólenes). En la columna de la derecha se indica el porcentaje de identidad respecto a Pru p 3.



2.1.3. Alérgenos vegetales

De todas las familias de proteínas vegetales conocidas, sólo una minoría son alergénicas, y la mayor parte de éstas pertenecen a un número reducido de familias. Funcionalmente, las proteínas presentes en alimentos vegetales se pueden clasificar en tres grandes grupos:

- a) **Proteínas de reserva:** se acumulan principalmente en semillas maduras y se movilizan durante la germinación para proporcionar una fuente de esqueletos de nitrógeno y carbono para el embrión y la planta en las primeras etapas del desarrollo. Las principales familias de proteínas de reserva descritas como alérgenos están resumidas en la Tabla 3.

Proteínas de reserva	Alimentos en los que se encuentran
Superfamilia Prolaminas Prolaminas	Trigo, centeno, cebada
Albúminas (2S)	Nuez, nuez pecana, anacardo, nuez de Brasil, avellana, pistacho, cacahuete, brécol, rábano, nabo
Superfamilia Cupinas Germinas o GLP (del inglés, "Germin-Like Protein")	Cebada, mandarina, naranja, pimiento
Vicilinas (7S)	Cacahuete, soja, lenteja, guisante, anacardo, nuez
Leguminas (11S)	Soja, cacahuete, avellana, nuez, nuez de Brasil, anacardo

Tabla 3: Principales familias de proteínas de reserva que incluyen uno o más miembros descritos como alérgenos.

- b) **Proteínas estructurales, catalíticas y reguladoras:** con funciones heterogéneas, se sintetizan en la planta de forma constitutiva o en respuesta a factores externos. En este grupo se incluyen las profilinas y las oleosinas entre otras (Tabla 4).

Proteínas estructurales, catalíticas y reguladoras	Alimentos en los que se encuentran
Profilinas	Melón, sandía, naranja, plátano, piña, melocotón, fresa, manzana, cereza, pera, avellana, pimiento, apio, zanahoria
Oleosinas	Avellana, cacahuete, sésamo

Tabla 4: Principales familias de proteínas estructurales, catalíticas o reguladoras que incluyen uno o más miembros descritos como alérgenos.

- c) **Proteínas de defensa:** son proteínas involucradas en los mecanismos de protección frente a las invasiones de patógenos, plagas y estrés abiótico. La mayoría presentan una estructura compacta estabilizada por puentes disulfuro, lo que las hace muy resistentes a tratamientos térmicos y enzimáticos [89]. A continuación, vamos a destacar las familias más relevantes como alérgenos alimentarios (Tabla 5).

Proteínas de defensa	Alimentos en los que se encuentran
Familia PR-1	Melón
Proteasas y β -1,3 glucanasas (PR-2)	Látex, plátano, kiwi, melón
Quitinasas y proteínas con dominio heveína (PR-3,4,8)	Aguacate, plátano, castaña, kiwi, papaya, tomate, piña, mango
Taumatinas (PR-5)	Manzana, pimienta, kiwi, cereza, melocotón
Inhibidores de α -amilasa/tripsina	Trigo, centeno, cebada, arroz, maíz
Peroxidasas (PR-9)	Trigo, cebada, tomate
Familia Kunitz	Patata, soja
Homólogos de Bet v 1 (PR-10)	Avellano, kiwi, familias <i>Lauraceae</i> , <i>Ericales</i> , <i>Rosaceae</i> (manzana, melocotón, cereza), <i>Apiaceae</i> y <i>Fabaceae</i>
Proteínas de transferencia de lípidos (PR-14)	Melocotón, manzana, albaricoque, cereza, ciruela, frutos secos, látex

Tabla 5: Principales familias de proteínas de defensa que incluyen uno o más miembros descritos como alérgenos.

2.2. Proteínas de transferencia de lípidos y síndrome LTP

2.2.1. LTP

Son una familia ampliamente distribuida en todo el reino vegetal. Hay dos tipos principales de LTP, proteínas de 7 kDa y de 9 kDa, siendo este último, el grupo importante para el desarrollo de AA. La estructura tridimensional de los miembros de esta familia está muy conservada, todas ellas tienen ocho residuos de cisteína, formando cuatro enlaces disulfuro, que son responsables de su alta estabilidad [90]. Aunque se han aislado de frutas, hojas, raíces y polen, la expresión principal está en la parte aérea de las plantas, sobre todo en la piel de las frutas [91, 92].

Además de su importancia en el contexto de la patología vegetal, las LTP, son una familia de panálrgenos implicados en reacciones mediadas por IgE y han despertado interés en relación con la alergia tanto a alimentos como a pólenes [14, 68, 93]. Constituyen los alérgenos más importantes de las frutas Rosáceas, como son el melocotón, la manzana, el albaricoque, la cereza y la ciruela. Se dividen a su vez en dos tipos: LTP específicas para ciertas clases de fosfolípidos y LTP no específicas, capaces de transportar diversas clases de lípidos en frutas, verduras, frutos secos y látex. [93]. En pólenes se han identificado en *Artemisia vulgaris* [94], *Platanus acerifolia* [95], *Parietaria judaica* [96] y *Olea europaea* [97]. Pueden estar presentes incluso en alimentos procesados y bebidas tales como cerveza, vino, mermelada y zumo [98, 99].

La importancia de las LTP como alérgenos reside en su alta resistencia a los tratamientos térmicos y la degradación por enzimas digestivas [100]. Esto les permite mantener su integridad en el tracto digestivo, donde pueden inducir una respuesta inmune. Además de conocerse su capacidad para sensibilizar vía gastrointestinal [93, 101], se ha descrito la posibilidad de sensibilizar vía inhalatoria [102] y cutánea [92, 103]. Este comportamiento las ha llevado a ser consideradas verdaderos alérgenos alimentarios, produciendo fundamentalmente dos patrones de manifestaciones clínicas: síntomas sistémicos (urticaria y anafilaxia) en un tercio de los casos, y SAO que afecta a dos tercios de los sujetos alérgicos. Datos recientes indican que la tasa de reacciones graves o fatales a LTP está aumentando especialmente en el área mediterránea. Además, la prevalencia de alergia a LTP en la población pediátrica dobla la obtenida en adultos. De hecho, hasta un 22% de los niños alérgicos se encuentran sensibilizados a LTP, y muchos desarrollan alergia clínica a un número indeterminado de frutas. Esto, junto con el aumento del número de casos graves en adultos indica que esta alergia alimentaria está aumentando en prevalencia y gravedad, especialmente alarmante en el sur de Europa [104].

2.2.2. Síndrome LTP

Conocido así por el perfil no homogéneo que presentan los pacientes sensibilizados a LTP, en base a la reactividad cruzada entre frutas y pólenes, que se produce por la conservación de alérgenos, panalérgenos y su amplia distribución entre especies vegetales no relacionadas taxonómicamente [104].

Como ya se ha comentado, las LTP son alérgenos relevantes en muchos alimentos vegetales, especialmente de la familia *Rosaceae* (melocotón (Pru p 3) [105, 106], cereza (Pru av 3) [107], ciruela (Pru d 3) [108], albaricoque (Pru ar 3) [109], manzana (Mal d 3) [110]), pero también podemos encontrarlas en otros alimentos vegetales sin relación taxonómica con las rosáceas

como son la avellana (*Corylus* 8) [111], nuez (*Juglans* 3) [112], castaño (*Castanea* 8) [94], uva (*Vitis* 1)[98], maíz (*Zea mays* 14) [113], espárragos (*Asparagus* 1) [114] y lechuga (*Lactuca* 1) [115].

Esta distribución tan ubicua de las LTP hace que sea muy común la sensibilización a múltiples alimentos, dando lugar al denominado síndrome LTP. En los últimos años se han demostrado reacciones cruzadas entre el principal alérgeno de melocotón, Pru p 3, y otras LTP alergénicas en cereza, albaricoque, ciruela [116], manzana [106], uva [98], castaño [94], maíz [205], arroz, nuez, avellana, y cacahuete [117] tanto *in vivo* como *in vitro*.

Los pacientes alérgicos a LTP, presentan un perfil complejo, que va desde la sensibilización sin clínica hasta la presentación de alergia a múltiples alimentos vegetales relacionados o no taxonómicamente (Síndrome LTP). En estos pacientes el riesgo de reacciones sistémicas y compromiso de la vida es mayor [92, 118]. Este síndrome, incluso en los pacientes que padecen reacciones leves-moderadas puede tener un gran impacto en la calidad de vida, dado el número tan elevado de alimentos que los pacientes tienen que evitar, así como en el coste socio-económico que produce.

2.3. Pru p 3

El melocotón es el principal alimento vegetal involucrado en las reacciones mediadas por IgE que afectan a la población adulta de los países del sur de Europa [119, 120]. En consecuencia, el Pru p 3, su principal alérgeno [93], desde su purificación hace 19 años [105], ha sido identificado como el alérgeno alimentario que muestra la mayor prevalencia de sensibilización (IgE positiva) en la población adulta española con alergia a los alimentos vegetales.

La alergia al melocotón más relevante clínicamente está asociada a Pru p 3 [92], y este alérgeno también media reacciones cruzadas entre melocotón y otros alérgenos LTP de alimentos vegetales [94] y también de algunos pólenes, como *Artemisia vulgaris* [93, 101] y *Platanus acerifolia* [95]. Esta es una cuestión relevante, considerando que la mayoría de los pacientes alérgicos al melocotón (alrededor del 80% en España) también sufren polinosis [121]. La abundancia de Pru p 3 en la piel de melocotón [91] junto con la epidermis aterciopelada que lo caracteriza, son probablemente la causa más frecuente de urticaria de contacto asociada a esta fruta [122]. De hecho, ésta es a menudo la primera manifestación de alergia al melocotón. Muchas personas informan de urticaria por contacto desde la infancia, apareciendo la primera reacción generalizada después de la primera ingesta [121].

Al igual que el resto de las LTP alergénicas, el Pru p 3 cuenta con una estructura tridimensional muy compacta y conservada, estabilizada por cuatro puentes disulfuro [93] (Figura 13), es altamente resistente a la digestión de proteasas y tratamientos térmicos. Por lo general, se asocia

a síntomas clínicos graves y sistémicos y pueden ser sensibilizador primario por ingestión. En conjunto, todas estas características han llevado a proponer el Pru p 3, como un modelo de alérgeno alimentario [123]. En los últimos años se ha desarrollado una forma recombinante con equivalencia inmunológica al Pru p 3 natural para su uso en el diagnóstico *in vitro* [124]. Se han identificado tanto epítopos de IgE secuenciales como conformacionales en la estructura tridimensional y se ha producido una variante hipoalérgica potencial [125-127].

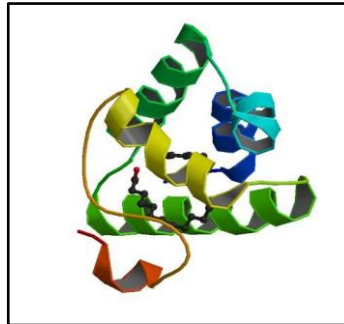


Figura 13: Modelo tridimensional de la LTP del melocotón, Pru p 3. Las cuatro hélices- α se muestran en diferentes colores.

2.4. Diagnóstico

Una historia clínica detallada proporciona datos que ayudan a identificar si la reacción está mediada por un mecanismo inmunológico, el posible alérgeno responsable, las manifestaciones clínicas, además de ayudar a la interpretación de las pruebas diagnósticas [19]. El diagnóstico de primera línea consiste en pruebas cutáneas y/o mediciones de niveles de IgEe en suero (Figura 14).

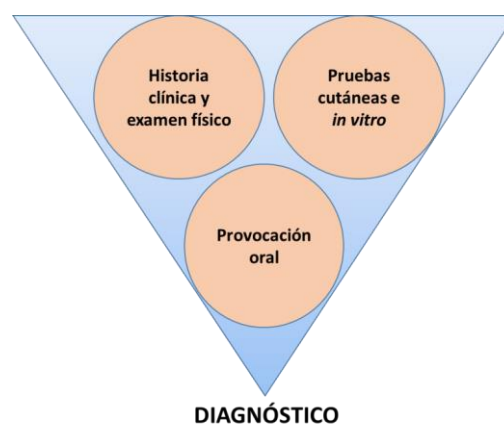


Figura 14. Esquema de elementos para el diagnóstico de la alergia alimentaria.

- a) **Prueba intracutánea:** Consiste en la introducción del alérgeno en la epidermis usando extractos y un dispositivo para erosionar o pinchar la piel. La presencia de un habón y la inflamación indica sensibilización a dicho alérgeno [128] (Figura 15).

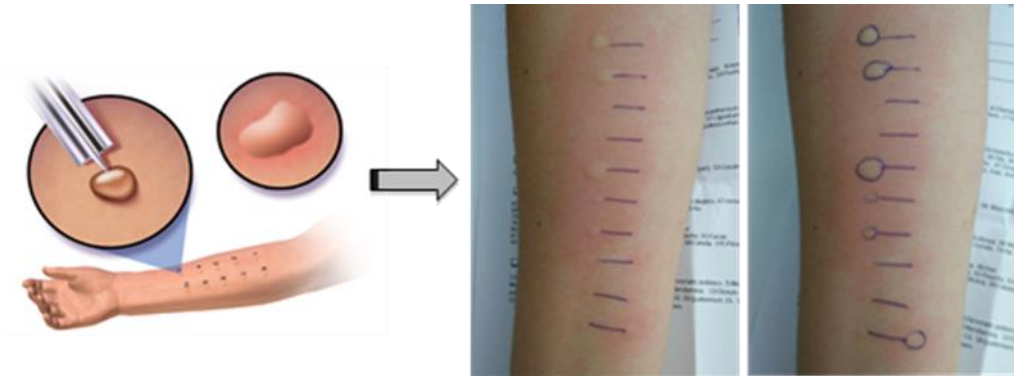


Figura 15. Técnica de prueba intraepidérmica (izquierda) y lectura del habón posterior (derecha).

- b) **Medición de anticuerpos en suero:** Nos permite cuantificar los niveles de IgEe frente a un alérgeno determinado y así poder determinar si el paciente está sensibilizado al mismo [22]. Dentro de los principales métodos diagnósticos validados que se utilizan actualmente a nivel hospitalario, está el fluoroinmunoensayo, siendo el más ampliamente utilizado el “ImmunoCAP System” (Figura 16), ya que cuenta con una fiabilidad elevada para medir anticuerpos semicuantitativamente.

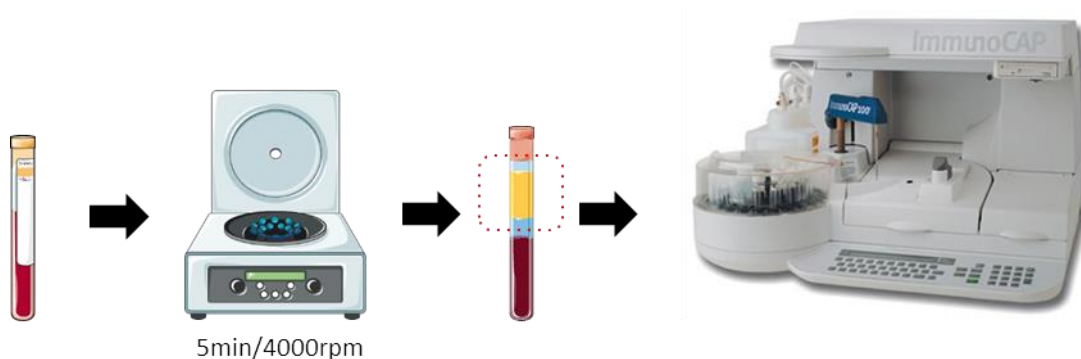


Figura 16. Procedimiento para obtención de muestras de suero (Izquierda). Equipamiento ImmunoCAP System (Derecha) para la medición de los niveles de IgEe.

Las dos pruebas anteriores son altamente sensibles en el diagnóstico de reacciones a alimentos mediadas por IgE, siendo la sensibilidad para pruebas cutáneas mayor del 90% y del 70-90% para la medición de IgE en suero [21, 129]. El tamaño del habón y el nivel de IgE están asociados con la probabilidad de AA, pero ninguno se correlaciona con la gravedad de la reacción. Sin embargo, la especificidad de ambas pruebas es menor al 50% ya que la sensibilización a menudo no tiene relevancia clínica y puede llevar a la evitación innecesaria de alimentos [130].

c) En los últimos años se está utilizando una nueva prueba *in vitro* celular el **test de activación de basófilos** (TAB). Dicho método es un ensayo funcional que simula *in vitro*, lo que ocurre *in vivo* a nivel celular, siendo una técnica segura para el paciente y un poco más cercana a lo que ocurre en la clínica [131, 132]. El TAB se basa en analizar, en la población de basófilos circulantes, la activación inducida por el alérgeno por un mecanismo mediado por IgE. Para analizar los basófilos activados generalmente se determina la expresión de dos glicoproteínas, CD63 y CD203c mediante citometría de flujo (Figura 17). En pacientes alérgicos a cacahuete se ha asociado la reactividad del basófilo con la gravedad de la reacción, y una verdadera AA, pudiendo distinguir con una sensibilidad del 97,6% y una especificidad del 96%, entre pacientes con alergia grave y pacientes sensibilizados pero tolerantes [133].

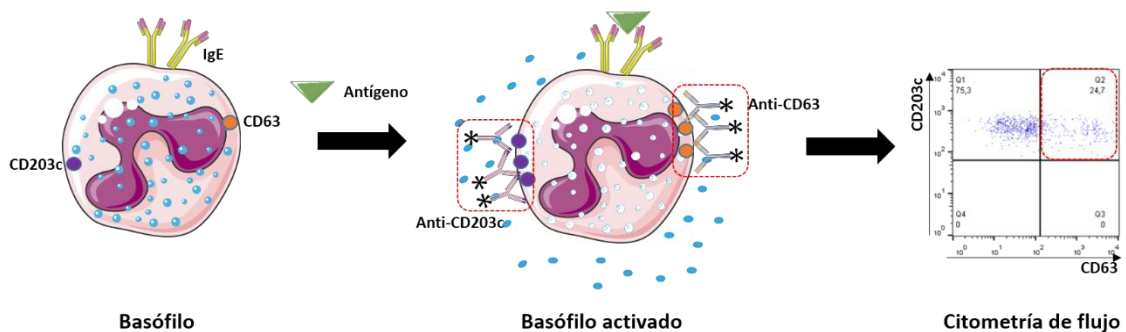


Figura 17. Representación de test de activación de basófilos.

d) **La prueba de provocación oral:** Es la prueba de referencia para el diagnóstico [134], debe de ser realizada por especialistas con experiencia en AA e implica que el paciente tenga que ingerir cantidades crecientes de un alimento en un ambiente médicamente supervisado. La provocación oral puede realizarse de tres modos:

- **Provocación oral abierta:** tanto el médico como el paciente conocen el alimento ingerido.

- **Provocación oral simple ciego controlada con placebo:** el paciente desconoce el alimento ingerido, así se ayuda a enmascarar la influencia que el componente psicológico del paciente pueda tener.
- **Provocación oral doble ciego controlada con placebo:** es la recomendada en general para el correcto diagnóstico. En ésta, tanto el médico como el paciente desconocen si se ha administrado el alimento o el placebo. Sirve para evaluar la posible aparición de tolerancia dentro de la historia natural de la enfermedad, y para establecer o excluir el diagnóstico de AA de forma definitiva. Sin embargo, es una técnica compleja y suele realizarse en el ámbito de la investigación clínica.

Es muy importante destacar que la prueba de provocación es un procedimiento con riesgo, puesto que puede inducir una reacción alérgica cuya intensidad no es predecible, pero razonablemente es necesario asumir este riesgo para tener un diagnóstico certero del paciente [135]. En el caso de reacciones muy graves o con antecedentes en el desarrollo de respuestas anafilácticas, este procedimiento es altamente desaconsejable, ya que implicaría un alto riesgo para el paciente. En cualquier caso, cuando sea aconsejable llevar a cabo dichas pruebas, éstas se deberán realizar en centros hospitalarios con los medios y el personal adecuado para ser capaz de manejar un procedimiento de emergencia, en el caso de que ocurra una reacción.

2.5. Tratamiento

Pese a los grandes avances en el estudio de la AA, hoy en día el tratamiento principal consiste en la eliminación estricta de la dieta del agente causal.

2.5.1. Evitación

El tratamiento primario es eliminar de la dieta los alimentos que producen síntomas inmediatos moderados, graves o reacciones sistémicas. Aunque existe escasa bibliografía sobre el efecto a nivel inmunológico que pueden producir la restricción dietética, ésta se muestra actualmente como la estrategia más seguida [136]. Sin embargo, estas dietas basadas en restricciones estrictas, tienen consecuencias en cuanto a calidad de vida de los pacientes. Además, cabe resaltar que los niños pequeños pueden estar en riesgo de padecer deficiencias nutricionales si la dieta no es estrictamente vigilada y complementada [137]. Todo ello unido a la posible ingestión accidental, indica que la AA puede ser potencialmente peligrosa para la vida del paciente [138]. La educación es por tanto fundamental para el paciente y sus cuidadores. Es muy importante que aprendan a

identificar las fuentes de origen de todos los alimentos a los que son alérgicos, reconocer los síntomas que derivarán en una reacción alérgica y su gravedad, así como su tratamiento cuando estas reacciones ocurran.

2.5.2. Tratamiento sintomático

Se trata del tratamiento enfocado a resolver los síntomas de una reacción alérgica. En este sentido, los antihistamínicos orales actúan neutralizando los efectos de la histamina, y se emplean en caso de que el paciente presente síntomas leves como el picor de ojos, goteo de nariz, picor de piel.

En caso de anafilaxia el tratamiento de elección es la adrenalina intramuscular. Como se ha mencionado anteriormente, se trata de un cuadro clínico que pone en peligro la vida del paciente, por ello, su tratamiento debe estar muy claro. Las guías internacionales ratifican que la adrenalina es la medicación de primera elección en la anafilaxia y, además, la única que reduce las tasas de hospitalización y muerte [139]. Su mecanismo de acción actúa a tres niveles: alfa-agonista sobre la hipotensión y el edema de la vía respiratoria; agonista-beta1 cronotrópico e ionotrópico aumenta la frecuencia cardíaca forzando la contractilidad cardíaca; y su efecto agonista-beta2 conduce a la broncodilatación y a la disminución de liberación de mediadores inflamatorios [140].

Se ha demostrado que la vía intramuscular para la administración de adrenalina es la más segura, presentando efectos adversos secundarios en sólo un 1% de los pacientes frente al 10% de los que la recibieron vía intravenosa [141]. Existen dispositivos de autoadministración en el mercado (Figura 18) con unas pautas en cuanto a conservación y mantenimiento, que deben conocer tanto el paciente, como su entorno. Sin embargo, éste no es un tratamiento curativo y además no elimina completamente el riesgo de anafilaxia grave o muerte, con hasta un 14% de muertes por reacciones debidas a alergia alimentaria a pesar de su administración temprana [17].

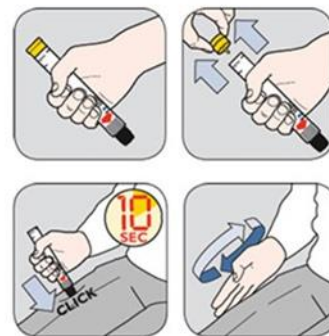


Figura 18. Ejemplo de dispositivo de autoadministración de adrenalina y consejos de utilización en caso de sufrir anafilaxia.

2.5.3. Tratamiento inmunomodulador

Hoy en día, el único tratamiento que puede alterar el curso de la enfermedad alérgica, y por lo tanto reestablecer la tolerancia inmunológica [47] es el conocido como inmunoterapia específica (ITE) con alérgenos. La ITE pretende modular la respuesta inmunológica revertiendo el patrón de la respuesta efectora de una reacción alérgica (Th2) hacia una de tolerancia (Th0/1), con la generación de células Treg específicas del alérgeno que suprimen las células T efectoras específicas [142].

Estas terapias han demostrado lograr inmunomodulación (generalmente, reducción en reactividad de mastocitos y niveles de IgEe, acompañados de aumentos en los niveles de IgG4e) así como desensibilización, un estado donde la exposición diaria constante al alérgeno aumenta la dosis a la que reacciona un paciente [143, 144]. Sin embargo, aunque la desensibilización disminuye la probabilidad de reacciones potencialmente mortales a las ingestiones accidentales, es un efecto transitorio que depende completamente de la exposición diaria al alérgeno. Por el contrario, la verdadera tolerancia clínica consistiría en un estado más permanente que permita al sujeto interrumpir la terapia activa, sin reaccionar tras la reintroducción del alérgeno en la dieta *ad lib*. Este es un avance importante en el tratamiento de la AA y es posible que el enfoque específico de alérgenos resulte en el primer tratamiento intervencionista modificador de la enfermedad clínicamente aprobado para la alergia alimentaria en los próximos años [145].

2.5.3.1. Mecanismos de la ITE

El objetivo de la ITE en AA es lograr inicialmente la desensibilización, es decir, el aumento temporal en el umbral de activación de células efectoras y posteriormente alcanzar la tolerancia oral, que se corresponde con el estado permanente de falta de respuesta al alérgeno sensibilizante, indicando la ausencia de respuesta alérgica específica debido a la eliminación o inactivación de las células T y/o la presencia de respuestas de IgG, IgA, Th1 y/o Treg activas (Figura 19).

Los cambios inmunológicos generados a través de la ITE pueden variar en función de la vía de administración, pero los principales cambios observados son:

1. **Disminución de la actividad y la capacidad de respuesta de las células efectoras.** Una observación importante es una disminución temprana de la actividad de mastocitos y basófilos para la degranulación y la anafilaxia sistémica [142]. Sorprendentemente, hay poca

información sobre los mecanismos por los cuales la ITE modifica y/o suprime estas respuestas inmunes. Se ha demostrado en ratones que la desensibilización específica al antígeno de los mastocitos es uno de los principales mecanismos subyacentes para la desensibilización oral [146] y que durante la ITE se liberan mediadores de la anafilaxia (histamina y leucotrienos) sin inducir una respuesta sistémica debido a su liberación gradual por debajo del umbral de anafilaxia. Esto hace que se disminuya el contenido de mediadores en los gránulos lo que también puede afectar al umbral de activación de mastocitos y basófilos específica del alérgeno [147].

2. **Células reguladoras y tolerancia de células T periféricas.** La inducción de un estado tolerante en las células T periféricas representa un paso esencial en la ITE. La tolerancia de las células T se caracteriza principalmente por la generación de células Treg específicas de alérgenos [148-150] que suprimen las células Th2 y la liberación de sus citoquinas ligadas (principalmente IL-4, IL-5, IL-13), llevando finalmente a la tolerancia oral [151]. Aunque todavía queda mucho por estudiar, hoy en día existen trabajos que demuestran estos cambios en el patrón de respuesta Th2 hacia Th1. Por ejemplo, se ha observado una disminución de la respuesta Th2 asociada a una inducción de células Treg productoras de IL-10, tras someter a ITE a pacientes alérgicos a *Dermatophagoides pteronyssinus* [152], a melocotón [153] y a otros alimentos como la manzana [154].
3. **Modulación de los niveles de anticuerpos IgE e IgG específicos.** La tolerancia de las células T periféricas se induce rápidamente durante la ITE, sin embargo, no hay evidencia de tolerancia en las células B en las primeras sesiones de tratamiento [37]. La ITE induce un aumento transitorio en los niveles séricos de IgEe seguida de una disminución gradual a lo largo de meses o años de tratamiento [155]. Por ello, los cambios en los niveles de IgEe no pueden explicar la disminución en la capacidad de respuesta a alérgenos específicos debido a ITE, ya que la disminución de la IgEe sérica es relativamente tardía y no se correlaciona con la mejoría clínica después de la ITE. En cuanto a la familia IgG, una semana después del inicio del tratamiento se puede observar un aumento en la IgG4e al alérgeno. Esta subclase de IgG, generalmente es considerada como protectora, ya que estos anticuerpos pueden capturar eficazmente el alérgeno antes de que éste alcance la IgEe unida a la célula efectora, y así prevenir la activación de los mastocitos y basófilos. Hay estudios que también sugieren que puede disminuir la señalización del receptor FcεRI de IgE y promover la internalización de IgE en los mastocitos sin desencadenar la degranulación de los mismos [156, 157].

Es muy posible que la disminución en la relación IgE/IgG4 durante la ITE sea una característica del cambio de predominio de una respuesta Th2 específica a una respuesta Treg, especialmente las células Treg productoras de IL-10 ya que esta citoquina es un potente supresor tanto de IgE total como específica, e inductor de la producción de IgG4 [50, 158]. Por lo tanto, la IL-10 no solo genera tolerancia en las células T; sino que también regula la formación de isotipos específicos hacia un fenotipo no inflamatorio.

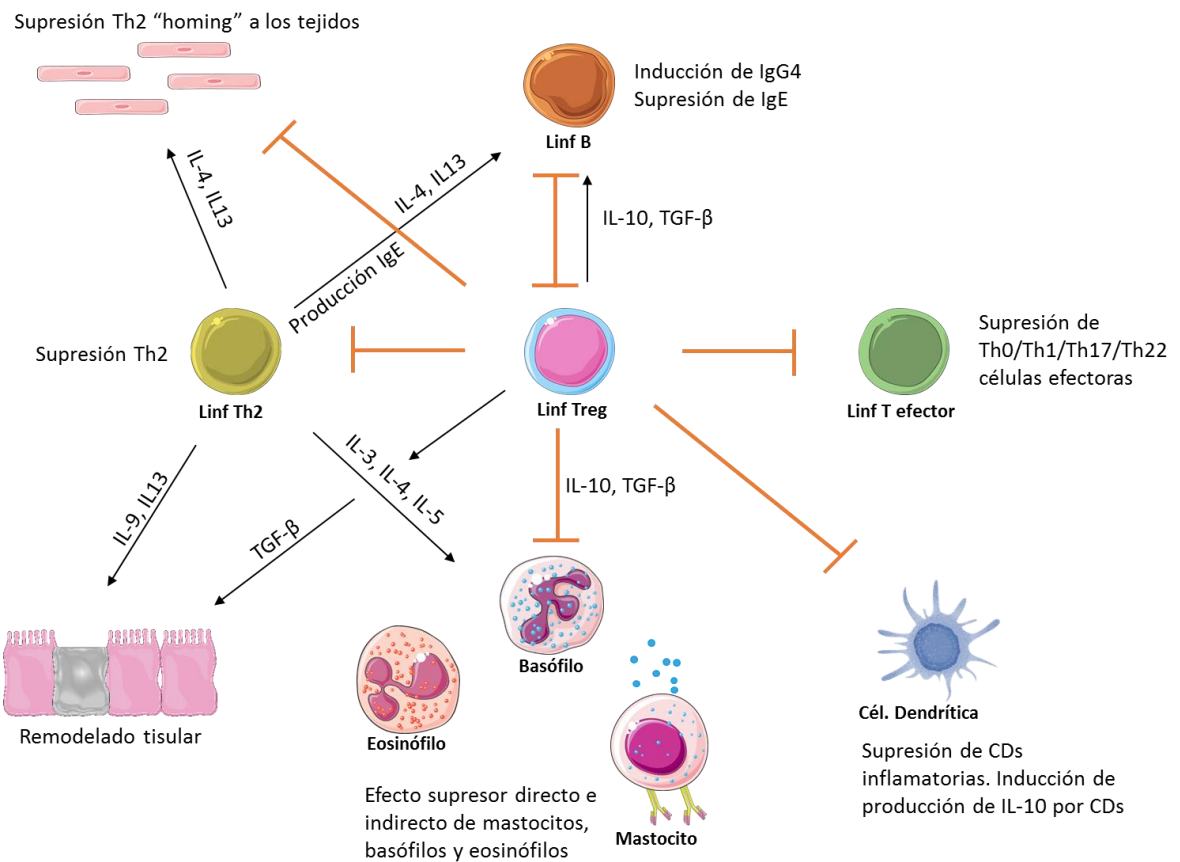


Figura 19. Representación del balance de células Th2 y Treg, y efectos por la ITE (representado en naranja).

2.5.3.2. Fuentes alergénicas y vías de administración de la ITE

El tratamiento de IT con alérgenos ha sido utilizado para modificar la enfermedad durante los últimos 100 años [159], incluida la AA [160, 161]. Existen diferentes vías de administración, subcutánea, epicutánea, oral y sublingual entre otras, cada una de ellas con sus ventajas e inconvenientes (Figura 20).



Figura 20. Posibles vías de administración de la inmunoterapia específica.

a) Inmunoterapia Subcutánea (ITSC)

El método más antiguo de administración de IT es a través de la vía subcutánea [159]. Cuando los alérgenos se administran subcutáneamente a un individuo sensibilizado, las células de Langerhans estimulan las células Treg, que aumentan la producción de IL-10 y TGF- β , lo que lleva un descenso de la respuesta alérgica y un aumento en la relación Th1/Th2 [162]. Las limitaciones de esta vía de administración tienen la desventaja de que el paciente tiene que acudir de forma frecuente a la consulta para recibir su administración, el miedo a las agujas, la incomodidad de las reacciones locales y el riesgo de reacciones sistémicas, que oscila entre el 0,05 y el 3,2% de las inyecciones, pudiendo alcanzar cifras mucho mayores con determinados alérgenos [163]. La necesidad de encontrar una ruta alternativa se ha centrado en la vía oral al hipotetizar las ventajas que se podrían derivar de la absorción directa desde la mucosa oral al torrente sanguíneo, evitando el metabolismo de primer paso por el hígado, y posibilitando el acceso a las células con capacidad inmune de la mucosa oral, ricas en células de Langerhans, tolerogénicas por naturaleza y con baja presencia de células efectoras como eosinófilos, basófilos y mastocitos [164, 165].

b) Inmunoterapia Oral (ITO)

El interés en la ITO ha ido creciendo en los últimos años especialmente para el tratamiento de AA. La ITO implica la administración diaria del alérgeno sensibilizante, generalmente usando una baja dosis de inicio, seguida por un aumento gradual hasta alcanzar una fase de mantenimiento.

Alcanzado este punto, los pacientes deben continuar durante años tomando la misma cantidad de alérgeno para lograr un estado de desensibilización permanente, aunque no es seguro que se alcance la tolerancia, por lo que la interrupción de la dosis diaria podría conducir a reacciones adversas [166]. En ensayos clínicos de ITO en alergias a leche de vaca [167-171], huevo [172, 173] y cacahuete [166, 174] se demostraron mejoras inmunológicas. Por ejemplo, se observó una sensibilidad reducida en la prueba cutánea, disminución del nivel de IgEe, y aumento del nivel de IgG4 y de la población de células Treg.

En general, la ITO que usa alérgenos nativos no modificados tiene una alta tasa de éxito para lograr al menos la desensibilización parcial en más del 80% de los sujetos [175, 176]. Sin embargo, solo conduce a un 25-40% de tolerancia oral específica y puede también provocar reacciones alérgicas. Por ejemplo, en un ensayo clínico con IT de cacahuete, el 92% de los pacientes experimentaron problemas respiratorios o síntomas de picazón, requiriendo dos sujetos tratamiento con epinefrina [143].

Las barreras que actualmente están impidiendo que la ITO esté entre los principales tratamientos en la práctica clínica incluyen la aparición de reacciones adversas, la necesidad de administración del alérgeno a largo plazo y la posibilidad de que la ITO pueda contribuir al desarrollo de esofagitis eosinofílica [177]. La investigación actual se centra en mejorar la seguridad y aumentar la tasa de tolerancia, por ejemplo, utilizando leche o huevo muy cocinados [178] o tratamiento combinado con Omalizumab, que es un agente biológico con propiedades anti-IgE, que está permitiendo a individuos alérgicos a cacahuete ingerir mayores cantidades de proteína durante su protocolo de ITO [179].

c) Inmunoterapia Epicutánea (ITEC)

La ITEC ha surgido recientemente como un método alternativo de administración de alérgenos en AA [180, 181]. Los alérgenos se administran en la piel directamente [182, 183] o mediante parches adhesivos [184]. Los efectos preventivos son mediados a través de las células tolerogénicas de Langerhans en la epidermis [185, 186], que al no estar vascularizada, previene reacciones sistémicas causadas por la circulación de alérgenos. Hay estudios preliminares en modelo de ratón que sugieren la inducción de células Treg y un cambio hacia Th1 [187, 188]. En un modelo reciente se ha observado el reclutamiento de células reguladoras FoxP3⁺ tras la aplicación epicutánea de parches con OVA en ratones sensibilizados y provocados. Este subconjunto de células Treg protege contra la AA mediante la supresión de la activación de los mastocitos de manera dependiente de TGF- β , pero no de anticuerpos IgE [189]. Sin embargo, en un estudio piloto en niños con alergia a leche de vaca, solo el 50% demostraron un aumento en la dosis acumulada tolerada tras la provocación oral, además, el 25% experimentaron reacciones adversas locales [190]. Esto nos

indica que son necesarios más estudios tanto experimentales como clínicos para monitorear la seguridad y eficacia terapéutica de la ITEC.

d) Inmunoterapia Sublingual (ITSL)

La administración sublingual se estudió por primera vez en 1986 para la IT a los ácaros del polvo [191]. En 1998, la OMS calificó la ITSL como una alternativa aceptable a la ITSC [192]. Aunque su primera aplicación fue para el tratamiento de la rinoconjuntivitis por aeroalérgenos, desde 2003 ha demostrado también ser útil para el tratamiento de la AA [193]. La ITSL se considera una mejora de la ITO, ya se utilizan extractos de alérgenos que son generalmente 1000 veces menos concentrados que los utilizados en la ITO, reduciendo así el riesgo de provocar reacciones graves. Consiste en la administración de gotas o tabletas que contienen el extracto alergénico debajo de la lengua por unos minutos, de forma generalmente diaria. Dichos tratamientos tienen una duración de 1 a 3 años [176] y actualmente, representa la mayoría de las prescripciones de IT en Europa, y su uso está aumentando constantemente en Estados Unidos [194, 195]. A pesar de que los mecanismos inmunológicos exactos todavía son objeto de estudio, se cree que las CD tipo Langerhans presentes en la mucosa sublingual son las encargadas de promover la tolerancia [196]. Esto ocurre debido a que estas células orales poseen FcεRI, con lo cual, las proteínas se retienen en la mucosa hasta 20 horas después de la administración [197]. Debido a esta absorción más gradual de las proteínas, el perfil de seguridad de la ITSL es superior al de la ITSC, lo que permite la administración en el domicilio [198].

La ITSL ha sido probada para extractos de alérgenos de alimentos como kiwi [193], avellana [199], leche de vaca [200], melocotón [201-203] y cacahuete [204]. Las mejoras clínicas obtenidas en dichos estudios indican que la ITSL podría reducir la sensibilidad en la prueba cutánea y aumentar el nivel específico de IgG4 como en el caso de la ITO. Si bien existen estudios de ITE a diferentes alérgenos alimentarios, existen pocos sobre LTP y más concretamente utilizando Pru p 3 en pacientes alérgicos a melocotón, alergia que, como se ha mencionado con anterioridad, tiene una alta prevalencia en el área Mediterránea. El estudio de Fernández-Rivas y cols. en 2009 [201], fue uno de los trabajos pioneros que utilizaban ITSL para melocotón, aunque este estudio era de muy corta duración, se incluyeron pocos pacientes y con manifestaciones clínicas de intensidad leve-moderada. Estudios recientes incluyendo pacientes con reacciones sistémicas [153, 203] han revelado que tras un año de ITSL se ha logrado inducir tanto una mejoría clínica de los pacientes como cambios inmunológicos. Dichos cambios se han observado no solo para el melocotón sino también para otros alimentos relevantes en la inducción de reacciones graves como el cacahuete. Los resultados en las pruebas cutáneas indicaron una disminución de la pápula, se observó una disminución significativa en IgEe sérica, así como un aumento en los niveles de IgG4e sérica y de la

reactividad de los basófilos tanto para Pru p 3 como para Ara h 9 (LTP del cacahuete). Además, se observó una reducción significativa del estado de maduración de las CD derivadas de monocitos y de la proliferación de células efectoras específicas de Prup 3 (Th2, Th9 y células plasmáticas) y un aumento de células Treg, de la expresión de PD-L1 y producción de IL-10 (Figura 21).

Como se ha ido describiendo, en los últimos años se ha estado comparando la eficacia y seguridad de la ITSL frente a otras vías de administración [169, 205]. Hasta ahora, se puede concluir que la ITO alcanza mayor porcentaje de tolerancia inmunológica pero, a costa de mayores efectos adversos y mayor dificultad para completar y mantener el tratamiento [206]. En cuanto a la ITSL, se han descrito efectos secundarios en hasta un 29% de los casos, siendo en la mayoría de los casos locales de la zona orofaríngea [199, 201]. Además de estos efectos indeseados, existen otras limitaciones cuando se utilizan extractos de alérgenos en la IT. Por ejemplo, la cantidad de extracto disponible o la dificultad para la obtención del mismo. Dentro de estas limitaciones, la más importante es la falta de homogeneidad de cada partida o lote de extracto, ya que existe una gran dificultad para obtener extractos homogéneos con cantidades constantes de proteínas alergénicas a partir de fuentes naturales que garanticen al 100% reproducibilidad, eficacia y seguridad [207, 208].

Con estos datos, vemos que, a pesar de las mejoras clínicas aparentemente positivas, hay incertidumbres con respecto a su seguridad y efectos a largo plazo, por lo que se hacen necesarias nuevas estrategias para mejorar el protocolo actual, que podrían incluir el uso de alérgenos modificados y otros agentes inmunomoduladores relevantes.

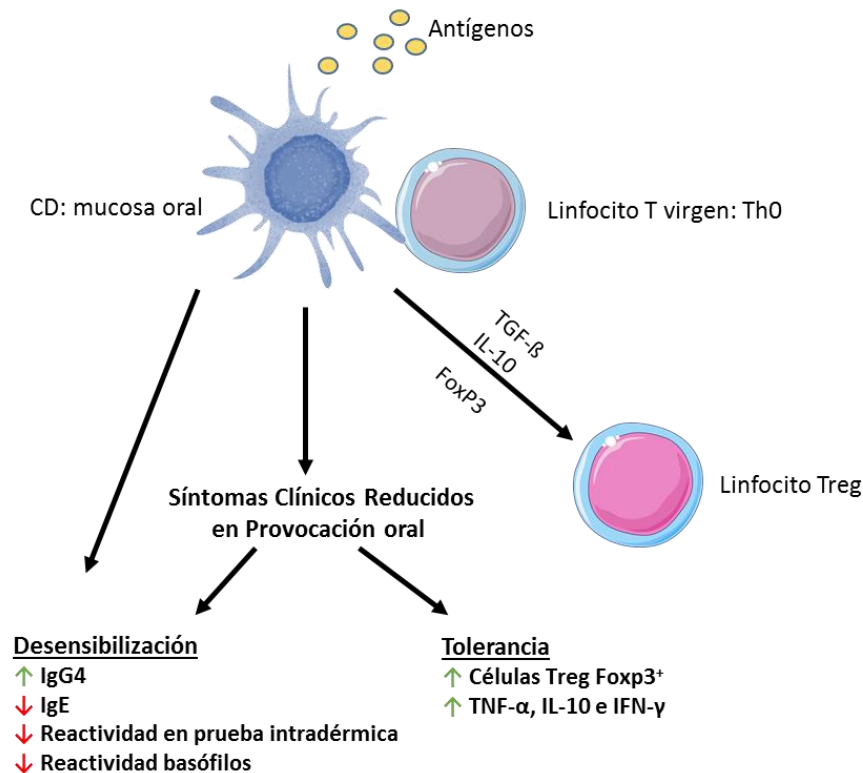


Figura 21. Representación de los mecanismos de la ITSL y sus efectos.

2.5.3.3. Nuevas estrategias para la ITE

Los principales obstáculos en la ITE con alérgenos son los frecuentes efectos secundarios adversos y la duración prolongada del tratamiento debido a la baja dosificación, restringida por el uso de extractos y alérgenos no modificados [145]. Por ello, en los últimos años ha habido un gran interés en el desarrollo de alérgenos que puedan provocar la modulación de la respuesta inmune necesaria para una terapia efectiva, evitando las vías que desencadenan los síntomas alérgicos y los indeseados efectos secundarios [209].

a) Hipoalérgenos

Los enfoques para reducir la alergenicidad conservando la inmunogenicidad de los alérgenos, tales como el uso de hipoalérgenos, son prometedores. Se han desarrollado para varios alérgenos de alimentos, entre ellos Pru p 3 [210], Ara h 2 y Ara h 6 [211] y se ha estudiado su utilidad para la inmunoterapia [212, 213]. Estos mutantes tienen alterada su capacidad para unir IgE, pero conservan la capacidad de estimular el sistema inmune, induciendo la proliferación de linfocitos T y la producción de anticuerpos IgG bloqueantes que compiten con la IgE. Algunas de las

estrategias implementadas para generar estas variantes hipoalérgicas implican mutagénesis dirigida al sitio dentro de los epítomos de unión a IgE, reestructuración de secuencias, modificaciones químicas, oligomerización e interrupción de la conformación alérgica entre otras [214-217]. A pesar de que estas estrategias generan variantes hipoalérgicas que disminuyen la reactividad de IgE, son necesarios más estudios para confirmar sus características antigénicas y su relación con la mejoría clínica en pacientes, ya que actualmente, la mayoría de los alérgenos alimentarios hipoalérgicos están en gran parte restringidos a las primeras etapas de investigación y caracterización preclínica.

b) Alérgenos recombinantes

Este tipo de alérgenos se obtienen a partir del ADN que codifica para el alérgeno, y su protocolo está diseñado para producir un alérgeno estandarizado y perfectamente caracterizado a nivel molecular e inmunológico, lo que implica mayor seguridad y eficacia que los alérgenos naturales [208]. Éstos pueden ser producidos en su forma natural, o como hipoalérgeno genéticamente modificado, que como se ha mencionado anteriormente, permite el aislamiento de la porción antigénicamente activa del alérgeno para producir inmunidad a largo plazo, mientras limita los eventos adversos relacionados con la IgE [218]. En los últimos años han sido investigados alérgenos recombinantes para pescado [220], mango [221], cacahuete [222] y melocotón [223], entre otros [224] y pese a que los resultados parecen prometedores, todavía son necesarios más estudios tanto de toxicidad como de tolerogenicidad.

c) ITE con péptidos

Los epítomos o determinantes antigénicos son cada uno de los sitios discretos de una macromolécula que son reconocidos individualmente por un anticuerpo específico (epítomos de células B) o por un TCR específico (epítomos de células T). Los epítomos de células T surgen de proteínas, que cuando son captadas por las CPA se degradan en pequeños fragmentos peptídicos. Estos péptidos se unen al MHC y cuando este conjunto es a su vez reconocido por las células T específicas del alérgeno en un contexto inflamatorio, conduce a reacciones alérgicas [225].

Actualmente, existe un interés creciente en el desarrollo de vacunas basadas en péptidos sintéticos que abarcan epítomos de células B y T [226]. Esto se debe a que dichos péptidos pueden inducir la desensibilización o tolerancia, pero carecen de las secuencias necesarias para puentear IgE en mastocitos y basófilos, por lo tanto, disminuyen potencialmente el riesgo de anafilaxia [227]. En general, la IT con este tipo de péptidos da como resultado la activación y regulación al alza de genes proinflamatorios, induce la no respuesta de células T y la producción de IgG, que inhibe el reconocimiento mediado por IgE de los alérgenos por las CD y previene la activación

mediada por IgE de células efectoras y posterior liberación de mediadores de la respuesta alérgica que finalmente suprimen las manifestaciones alérgicas [228, 229] (Figura 22). Además, al utilizar determinados péptidos, estas terapias permiten centrarse únicamente en epítopos relevantes, que sean inmunogénicos, evitando aquellos que conducen a respuestas no protectoras, evasión inmune o efectos secundarios no deseados [230].

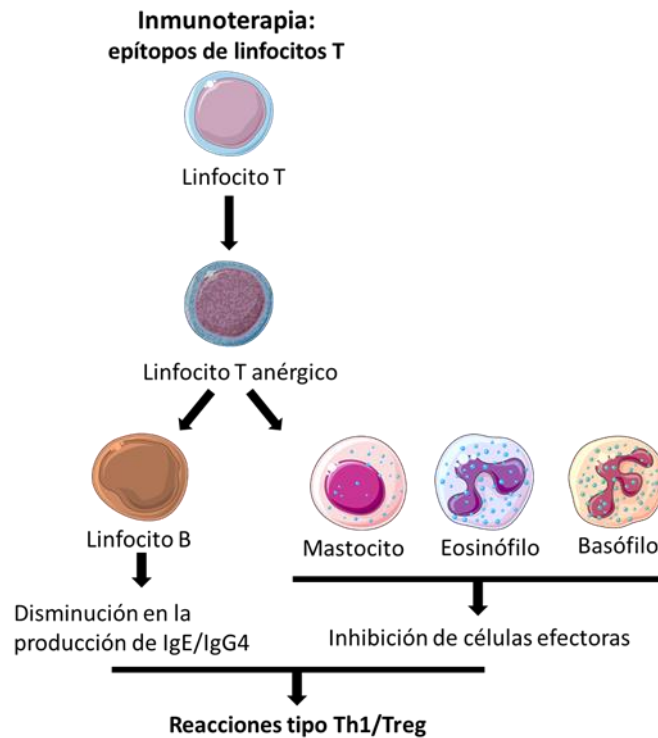


Figura 22. Representación de los mecanismos y células implicadas en la ITE con epítopos de células T.

En los últimos años, la IT basada en estos péptidos ha sido utilizada para la desensibilización a alérgenos tales como epitelio de gato, ácaros del polvo, polen y veneno de abeja, pero sus beneficios potenciales para tratar la AA están comenzando a ser explorados. Los principales epítopos de células T de alérgenos alimentarios, como Ara h 1 y Ara h 2 [231-233], β -lactoglobulina [234] y Pru p 3 [127, 235] han sido mapeados y actualmente se está estudiando su eficacia para el tratamiento.

En cuanto al Pru p 3, en el estudio llevado a cabo por Tordesillas y colaboradores, se definieron los principales epítopos T por un mapeo de la secuencia de Pru p 3, mediante el análisis de la respuesta proliferativa de las células T de sujetos alérgicos y no alérgicos frente a un panel de péptidos de la secuencia de Pru p 3. Como resultado, se seleccionaron los dos péptidos con mayor capacidad de reconocimiento y activación celular, que correspondían a las regiones Pru p 3₆₅₋₈₀ y Pru p 3₂₅₋₃₅[127].

A pesar de todos estos avances, el desarrollo de terapias efectivas basadas en péptidos todavía requiere superar una serie de importantes dificultades, incluida la identificación de rutas óptimas de administración, la baja inmunogenicidad intrínseca del péptido, y la tarea de combinar diferentes tipos de epítomos para activar la respuesta humoral y celular para conseguir una respuesta inmune adecuada.

d) Adyuvantes inmunomoduladores

Con el fin de conseguir terapias más seguras y efectivas, se están utilizando los llamados “adyuvantes”, que tienen como objetivo modular la inmunogenicidad de alérgenos específicos, sin ser ellos mismos farmacológicamente activos. Éstos han sido utilizados durante muchos años en vacunas y recientemente están surgiendo nuevos usos para ITE [236]. Por ejemplo, el hidróxido de aluminio es un adyuvante de uso común en ITE con alérgenos [237]. Pero, a pesar de ser eficaz y tener un buen perfil de seguridad, se necesitan nuevos adyuvantes para superar los problemas actuales en la inmunoterapia convencional [238].

Es conocido que las CD tienen un papel importante en la generación de la respuesta inmune así como en la modulación de la misma, ya sea de tolerancia o alérgica, dependiendo del estadio de inmadurez o madurez, respectivamente, en el que presenten el antígeno a los linfocitos T [239]. Entre los factores que inducen maduración en las CD están los denominados PAMPS (del inglés “*pathogen-associated-molecules patterns*”), incluyendo ADN o ARN vírico o bacteriano, motivos ricos en CpG, o endotoxinas (LPS), que interactúan a través de los receptores tipo Toll (TLR, del inglés “*Toll Like Receptor*”). Existen estudios que indican que sus ligandos pueden actuar con las CD de forma cooperativa produciendo una estimulación de células T más eficiente, como ha ocurrido en estudios realizados con Pru p 3 [240]. Si bien es cierto que la activación de CD con diferentes ligandos de TLR hace que presenten el antígeno a los linfocitos T generando la respuesta efectora Th1, también se han descrito ligandos como PamCSK4 que inducen una respuesta Th2 [241]. Por ejemplo, en estudios llevados a cabo en pacientes con alergia a fármacos, se ha detectado que la presencia de diferentes agonistas de TLRs (PAM, LPS, R848) es crítica para la eficiencia en la inducción de las respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas [242]. Y además, se ha observado que una concentración alta de LPS es capaz de inducir, a través de TLR4, una respuesta Th1, mientras que a concentraciones bajas estimula una respuesta Th2 [243]. Por todo ello, los TLRs se han propuesto como objetivos interesantes para el diseño de adyuvantes de nuevas vacunas [244-246].

Entre los TLRs estudiados, los ligandos de TLR9 han demostrado ser tanto seguros como efectivos para reducir los síntomas respiratorios en pacientes con rinitis alérgica y en un modelo murino de enfermedades respiratorias [247-249]. Para AA, sin embargo, solo se han realizado un número

reducido de estudios [250, 251, 252], en los que se ha utilizado CpG, una molécula de ADN de cadena simple corta, que ha sido capaz de aumentar la respuesta reguladora en modelo de ratón alérgico a cacahuete. En dichos estudios se ha observado un aumento significativo en los niveles de IgG2a, así como una disminución en niveles de IgE e IgG1 y citoquinas Th2, junto con protección contra la anafilaxia tras la provocación.

Si bien los TLRs tienen una función importante, no son los únicos receptores implicados en la modulación de la respuesta inmune a través de las CD. En este sentido, se ha demostrado que la interacción a través de receptores de lectina tipo C (CLR, del inglés “*C-type lectin receptors*”) mejora la captación y presentación de diferentes compuestos que modulan la respuesta inmunológica. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo por Le Guevel y colaboradores, se observó una reducción del 60% en la absorción de nanopartículas de oro recubiertas de manosa en presencia de un inhibidor de C-lectina, lo que demuestra la especificidad en el reconocimiento de la manosa por las CD[253]. Otros estudios realizados con glicodendrimeros de manosa en pacientes alérgicos a melocotón, también han demostrado un reconocimiento específico a través de la interacción con CLR, induciendo un estado de maduración de las CD y la proliferación de linfocitos específicos [254].

Dentro de los CLR, el receptor DC-SIGN ha sido estudiado en enfermedades alérgicas, demostrando que alergoides conjugados con manano aumentan la absorción del alérgeno e inducen la producción de células esplénicas Treg FoxP3⁺ [255, 256]. Este conocimiento sobre el receptor DC-SIGN y su implicación en procesos de señalización ha permitido el establecimiento de una correlación entre el tipo de carbohidrato que interacciona con este receptor y la polarización de la respuesta (Th1 o Th2) encontrada [257-259]. En este sentido, se ha demostrado que la interacción de manosa con DC-SIGN produce un aumento de la respuesta Th1 y Treg [260, 261], lo que nos indica que además de adyuvantes son moléculas moduladoras.

e) Sistemas multivalentes

En los últimos años se ha avanzado en la forma y administración de la inmunoterapia, siendo uno de los principales retos el conseguir la correcta interacción con la diana celular. Para ello, se han estudiado y probado diferentes vías de administración (oral, subcutánea, sublingual, etc...) en combinación con diferentes adyuvantes, pero sobre todo qué tipo de estructura favorece la captación y reconocimiento de la inmunoterapia por parte del sistema inmune. Por ejemplo, se han desarrollado nanopartículas biodegradables que encapsulan alérgenos, los cuales son liberados de manera continua o pulsátil, modulando así la respuesta inmune y disminuyendo los eventos adversos [262]. Hasta ahora, los estudios se han limitado a modelos murinos sensibilizados con alérgenos, pero los tipos de nanopartículas disponibles y los alérgenos utilizados

continúan aumentando [263]. Se han utilizado nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) para encapsular polen de abedul recombinante y han demostrado modular la respuesta alérgica Th2 tras una sola dosis [264]. Por otra parte, nanopartículas de poli (ácido g-glutámico) han demostrado la capacidad de inducir mediadores inmunomoduladores que influyen en el equilibrio de las respuestas Th1, Treg y Th2, mejorando la proliferación y la producción de IL-10 por linfocitos T de memoria específicas para alérgenos y aumentar la tolerancia inmune [265]. El uso de nanopartículas como adyuvantes en la inmunoterapia se ha expandido también para el tratamiento de AA. Por ejemplo, nanopartículas de poli(anhídrido) cargadas de proteína de cacahuete han mostrado una mejora y modulación tanto de las respuestas inmunes humorales como celulares, con aumento de una respuesta dominada por Th1 [266].

▪ Dendrímeros

Un tipo de nanoestructuras utilizadas como sistemas multivalentes son los dendrímeros, que son partículas monodispersas, biocompatibles, biodegradables y no tóxicas [267]. Su arquitectura modular permite la funcionalización con varias unidades, repetidas o diferentes, de péptidos alérgicos que quedan expuestos en la superficie de la nanoestructura (Figura 23). Tal multivalencia del epítipo permite aumentar el número de péptidos de células T interactuando simultáneamente con las células inmunes implicadas en la reacción alérgica. Además, se puede lograr una mejora de la interacción de este dendrímero con el sistema inmunológico dependiendo de la naturaleza de la nanoestructura, es decir, el tamaño de la misma o las moléculas unidas a ella, que facilitan la captación y la presentación de antígenos por parte de las CD [253, 268], lo que permite una respuesta inmune efectiva hacia un perfil Th1 o regulador.

Un ejemplo de ello son los llamados glicosistemas o glicodendropéptidos, basados en la unión de manosas y péptidos de células T a estructuras dendriméricas para construir sistemas multivalentes. De esta manera, se consigue presentar en una misma estructura tanto los péptidos de células T como el agente que actuará como adyuvante. En estudios recientes, estos sistemas han demostrado una alta eficiencia en cuanto a captación, al dirigirse al receptor DC-SIGN y una elevada capacidad inmunomoduladora [268, 269].

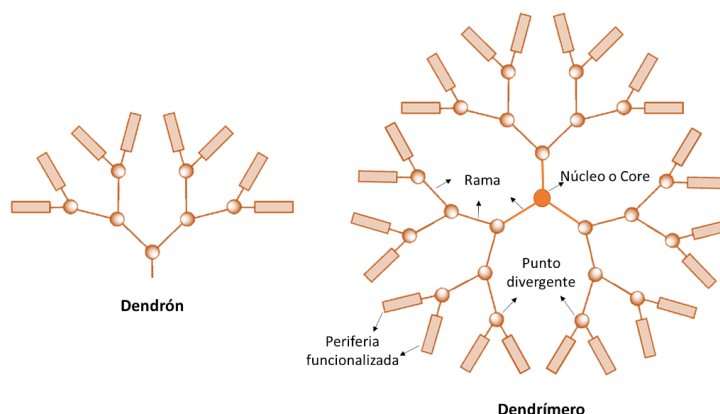


Figura 23. Estructura de un dendrímico y de su unidad (dendrón).

2.6. Modelos experimentales en alergia alimentaria

Como hemos visto hasta ahora, proporcionar una mejoría en las opciones terapéuticas se ha convertido en una vía importante de la investigación en AA. El alto riesgo de anafilaxia y otras reacciones graves es un factor importante que limita el desarrollo de las terapias para la AA en humanos [270, 271]. En este contexto, los modelos animales juegan un papel importante al proporcionar una plataforma para analizar estos tratamientos y garantizar una evaluación de su seguridad a nivel preclínico, antes de la aplicación terapéutica en humanos (Tabla 6). Por su parte, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés “*Food and Drug Administration*”) requiere pruebas con animales antes de lanzar un nuevo medicamento, con lo cual, los modelos preclínicos en animales son un paso necesario para lograr esta meta [272]. En la AA, dichos modelos ya han apoyado los avances de la terapia en tres áreas clave: 1) validación de las estrategias terapéuticas existentes [273], 2) análisis de la utilidad de las terapias existentes [274], y 3) desarrollo de nuevas terapias [251, 275].

Ventajas de la utilización de modelos animales para la alergia alimentaria
Permiten una investigación exhaustiva de los mecanismos de sensibilización alérgica o tolerancia a alérgenos específicos bajo condiciones ambientales controladas, que promueven una mejor comprensión de la etiología de la AA
Permiten definir los mecanismos efectoros de la AA
Permiten la investigación experimental para delinear las influencias asociativas o causales de los hallazgos epidemiológicos en humanos, que podría facilitar estrategias de prevención
Permiten la validación y la utilidad de terapias existentes, así como el desarrollo de nuevas terapias, lo que puede conducir a importantes mejoras en el tratamiento de pacientes con AA

Tabla 6: Ventajas de la utilización de modelos animales para la alergia alimentaria.

2.6.1. Modelos murinos

El ratón es el animal de laboratorio predominantemente utilizado para estudiar el desarrollo de muchas enfermedades, generalmente favorecidos por su tamaño, ciclos de cría cortos, fácil manejo y la relativa capacidad de manipulación genética en comparación con modelos más grandes [276]. El uso de la especie murina en la investigación durante varias décadas ha llevado al desarrollo continuo de herramientas celulares y moleculares para permitir una investigación exhaustiva de los mecanismos y vías de interés [277]. Hoy en día, los ratones tienen la caracterización más completa de su biología, inmunología y composición genética.

Una de las ventajas fundamentales del uso de modelos de ratón para estudiar la AA es que la sensibilización o tolerancia se puede inducir a alérgenos específicos bajo condiciones ambientales y genéticas controladas, lo que no siempre es posible en humanos. Este aspecto permite llevar a cabo investigaciones extensas y precisas sobre los mecanismos implicados en la etiología de la enfermedad, como la identificación de posibles desencadenantes, así como vías implicadas en la AA [272].

La comprensión avanzada de su sistema inmune y su similitud con el humano en mecanismos tales como las respuestas Th1 y Th2 [278, 279], hacen que este animal sea particularmente atractivo para el estudio de los mecanismos implicados en la AA. Por ejemplo, las respuestas Th2 de los ratones dan como resultado la producción de IgE e IgG1, mientras que las respuestas Th1 conducen a la producción de IgG2a. Sin embargo, a pesar de las similitudes entre los sistemas inmunes del ratón y del ser humano, hay que considerar las diferencias. Por ejemplo, en humanos, la IgE es el único isotipo de inmunoglobulina que desencadena directamente la degranulación de los mastocitos y la posterior manifestación de anafilaxia. El papel de la IgG se limita principalmente a los posibles competidores para la unión de alérgenos. En contraste con los humanos, la IgG1 de ratón también desencadena directamente la degranulación de mastocitos y junto con la IgE juega un papel importante en la anafilaxia cutánea pasiva [280, 281].

Otro de los obstáculos implicados en el desarrollo de modelos murinos de alergia alimentaria es, como en la mayoría de los humanos, la tendencia del sistema inmunitario a desarrollar tolerancia oral frente a los antígenos ingeridos [282]. Para solventarlo, los investigadores se han centrado en ciertas cepas de ratones, como C3H/HeJ y BALB/c [41, 282, 283] que muestran respuestas Th2 más elevadas que otras cepas murinas comunes. A pesar de que los mecanismos inmunes responsables de la ruptura en la tolerancia oral no se comprenden completamente, la evidencia en modelos de ratón indica que existen diferentes factores que contribuyen de manera importante a la sensibilización alérgica y la AA, como pueden ser alteraciones en la función reguladora de las

células Treg y factores ambientales tales como la microbiota [272]. En la actualidad, la disponibilidad de reactivos y el aumento del número de cepas de ratones transgénicos y *knock-out* proporcionan herramientas valiosas para investigar esta gran variedad de células inmunes y mediadores en las AA. Prueba de ello son los numerosos estudios que se han llevado a cabo recientemente, obteniendo resultados prometedores [251, 275, 284, 285].



Figura 24. Ratón de la cepa BALB/c, utilizada para desarrollar nuevas terapias para alergia alimentaria.

En resumen, los modelos murinos de alergia a alimentos son herramientas muy útiles para diseccionar la etiología, mecanismos y estrategias preventivas, así como ayudar en la identificación, validación y desarrollo de terapias antes de que progresen hacia los pacientes. A pesar de que la aplicación de estos modelos animales para las enfermedades humanas requiere una cuidadosa y profunda consideración e interpretación, su utilidad para facilitar descubrimientos ha sido demostrada repetidamente y en muchos niveles. Particularmente en el entorno de la AA, donde los riesgos de reacciones adversas a la terapia son un problema importante para los pacientes, los modelos animales son indispensables para desarrollar de manera efectiva y ética nuevos tratamientos.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

JUSTIFICACIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

La AA es en la actualidad un problema de salud grave, ya que produce reacciones que pueden comprometer la vida del paciente. La prevalencia de la AA está aumentando de forma progresiva, afectando al 3-5% de la población adulta y al 5-8% de la población infantil [2, 9]. En el área mediterránea, las reacciones alérgicas a frutas, concretamente de la familia *Rosaceae*, son las más frecuentes [13], produciendo síntomas sistémicos (urticaria y anafilaxia) en un 30% de los casos, siendo la familia de la LTP el alérgeno sensibilizante en un 70% de los mismos. Dentro de la familia de las LTP, el Pru p 3 es el alérgeno con mayor prevalencia en la inducción de AA en nuestra zona, asociado principalmente a alergia a melocotón [119]. La gravedad y las reacciones cruzadas causadas por las LTP hacen que el manejo de los pacientes sea difícil. Además, se ha observado que la prevalencia en la población pediátrica duplica la de los adultos. De hecho, hasta un 22% de niños alérgicos están sensibilizados a LTP, desarrollando alergia clínica a un número indeterminado de frutas [286, 287], y un riesgo permanente de reacción que afecta la calidad de vida del paciente y su entorno familiar [288].

Considerando que las reacciones alérgicas a LTP pueden ser graves y en ocasiones fatales, su manejo se hace complejo, aún más, si tenemos en cuenta que uno de los tratamientos más ampliamente aplicados en la actualidad es la evitación del alimento, medida difícil de implementar debido al carácter ubicuo de estas proteínas, que obliga a los pacientes a seguir dietas muy restrictivas, siendo éstas difíciles de cumplir y sufriendo el riesgo de ingerir el alimento de manera accidental [137, 138]. Actualmente, la ITE con alérgeno es el único tratamiento etiológico de la enfermedad alérgica con capacidad de modificar la historia natural [2], induce tolerancia a los alérgenos con los que das la ITE y se puede incluso llegar a evitar que el paciente se sensibilice a más alimentos. Aunque es un tratamiento prometedor, los resultados actuales son moderados, probablemente porque se usan dosis bajas del alérgeno ya que al utilizar extractos completos, con mezcla de proteínas [201, 203], se aumenta el riesgo de inducción de reacciones alérgicas. Para aumentar la seguridad y eficacia de estos tratamientos se han descrito diferentes estrategias, una de ellas incluye el uso de péptidos que contengan los determinantes antigénicos responsables de la respuesta alérgica pero sin la posibilidad de que puenteen las IgE de la superficie de células efectoras, mastocitos y basófilos [229]. Sin embargo, aunque el uso de péptidos mejora sustancialmente la seguridad, el reconocimiento puede no ser idéntico al de la proteína nativa haciendo que la respuesta inmune sea de menor intensidad. Esto podría solventarse añadiendo moléculas adyuvantes que estimulen el sistema inmunológico y que además produzcan una modulación de la respuesta. En este sentido, se han propuesto los ligandos de los receptores tipo Toll y de DC-SIGN de CD como adyuvantes y moléculas moduladoras [251, 260]. Por otro lado, el uso de nanoestructuras que transporten ambos componentes, podría ser más efectivo a la hora de

conseguir la interacción con el sistema inmunológico e inducir una respuesta de tolerancia más eficaz que si añadimos cada uno de estos elementos por separado durante la ITE.

Otro punto clave, es la falta de conocimiento de los diferentes mecanismos inmunológicos implicados en la adquisición de tolerancia durante la ITE con alimentos, ya que aunque se han evaluado recientemente, no han sido analizados en profundidad [202, 289]. El estudio de estos posibles cambios que se generan en las respuestas de células T efectoras y reguladoras, así como la producción de anticuerpos específicos durante la ITE es necesario para comprender los mecanismos implicados en la misma. La evaluación de estos mecanismos será crítica para comprender tanto el funcionamiento de la IT como las circunstancias que conllevan a una falta de respuesta hacia la misma.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente citado, sería de gran utilidad desarrollar un modelo animal de AA, centrado en la respuesta alérgica a LTP, con el fin de determinar en profundidad los mecanismos implicados tanto en la AA como en la respuesta de tolerancia adquirida durante un tratamiento de ITE. Además, al desarrollar nuevas opciones de tratamiento para modificar la historia natural de la alergia a LTP, estamos dando un paso más para conseguir seguridad y eficacia, aspectos muy importantes para mejorar la calidad de vida tanto de los pacientes como de su entorno.

OBJETIVOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Objetivos Generales

1. Identificar biomarcadores en respuestas anafilácticas y de tolerancia inducida a alérgenos alimentarios de origen vegetal (melocotón).
2. Desarrollar un sistema de inmunoterapia para la inducción de tolerancia en reacciones a alimentos vegetales.
3. Estudiar los cambios inmunológicos durante una inmunoterapia alérgeno específica usando estructuras dendriméricas y péptidos de Pru p 3.

Objetivos específicos

1. **Desarrollar un modelo experimental de anafilaxia al melocotón en ratones**
 - 1.1. Analizar la respuesta inmunológica humoral y celular a melocotón tras la sensibilización a Pru p 3, mediante determinación de anticuerpos (IgE, IgG1 e IgG2a), marcadores celulares, citoquinas, factores de transcripción, así como la respuesta proliferativa específica.
2. **Desarrollar un modelo de tolerancia en ratones con anafilaxia al melocotón utilizando estructuras dendriméricas con péptidos T de Pru p 3 y ligandos de receptores tipo Toll**
 - 2.1. Evaluar la eficacia clínica de la inmunoterapia mediante pruebas de provocación con Pru p 3 y análisis de la sintomatología *in vivo*.
 - 2.2. Analizar la evolución de la respuesta inmunológica humoral a melocotón durante la inmunoterapia mediante determinación de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos a Pru p 3 y a nivel celular analizando los cambios fenotípicos, células T efectoras (Th2), reguladoras (Treg), de tolerancia (Th1) y células dendríticas, así como la respuesta proliferativa específica, marcadores celulares, citoquinas y factores de transcripción durante la inmunoterapia.
3. **Desarrollar un modelo de tolerancia en ratones con anafilaxia al melocotón utilizando estructuras dendriméricas con péptidos T de Pru p 3 y ligandos de receptores DC-Sign**
 - 3.1. Evaluar la eficacia clínica de la inmunoterapia mediante pruebas de provocación con Pru p 3 y análisis de la sintomatología *in vivo*.

3.2. Analizar la evolución de la respuesta inmunológica humoral a melocotón durante la inmunoterapia mediante determinación de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos a Pru p 3 y a nivel celular analizando los cambios fenotípicos, células T efectoras (Th2), reguladoras (Treg), de tolerancia (Th1) y células dendríticas, así como la respuesta proliferativa específica, marcadores celulares, citoquinas y factores de transcripción característicos durante la inmunoterapia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

La AA representa un problema de salud cada vez mayor que afecta negativamente a la calidad de vida de niños y adultos [68]. De los alérgenos alimentarios, los procedentes de alimentos vegetales son los más frecuentemente implicados, especialmente en adultos, siendo el Pru p 3, LTP del melocotón, uno de los panalérgenos más importantes en el área mediterránea y que puede causar reacciones potencialmente mortales [93, 290]. La gravedad de las reacciones que provocan las LTP limita el desarrollo de estudios en humanos para la evaluación de los mecanismos implicados y plantea la necesidad de realizar estudios en modelos animales. Sin embargo, aunque se han generado modelos de ratón frente a Pru p 3 con producción de IgEe [210], éstos no son modelos de anafilaxia completos, confirmados por parámetros tanto *in vivo* como *in vitro*. El desarrollo de dicho modelo es fundamental para muchas aplicaciones, por ejemplo, para evaluar la seguridad y los beneficios potenciales de la ITE para alérgenos alimentarios.

Se cree que el desarrollo de las células Th2 es un paso crítico en los mecanismos subyacentes de la AA. Sin embargo, los factores implicados en el desencadenamiento de la activación de células Th2 específicas de alérgenos alimentarios siguen siendo poco conocidos en la actualidad. Algunos datos indican que la tendencia de algunas proteínas a desencadenar la respuesta inmune adaptativa hacia un patrón Th2 se debe a su capacidad para promover la señalización de TLR4 [291]. Además, la alergenidad de algunas proteínas para inducir una respuesta Th2 podría mejorarse en presencia de adyuvantes [292, 293]. De hecho, se cree que la exposición del sistema inmune de la mucosa a compuestos bacterianos como el LPS junto con antígenos alimentarios puede conducir a una sensibilización y alergia al antígeno alimentario. Estos productos bacterianos pueden promover la sensibilización alérgica a través del TLR4 [294, 295]. Estudios previos han demostrado que, dependiendo de la concentración, el LPS puede modular la respuesta hacia un patrón Th1 a altas concentraciones o potenciar la inducción de una respuesta Th2 cuando se usan concentraciones bajas (<100 ng) [292, 296].

En el presente estudio, hemos demostrado que la respuesta anafiláctica específica a Pru p 3 puede generarse después de la sensibilización nasal a Pru p 3 en combinación con LPS como adyuvante. Esta respuesta anafiláctica se demostró *in vivo* por una caída de temperatura corporal significativa junto con la aparición de síntomas de anafilaxia en el grupo de ratones inmunizados con Pru p 3 + LPS. Este modelo anafiláctico conduce a niveles elevados de inmunoglobulinas tipo Th2 (IgE e IgG1) específicas a Pru p 3 que concuerdan con los resultados observados en modelos de sensibilización para otros alérgenos [210], obtenidos usando una vía de administración (intraperitoneal) y adyuvante (hidróxido de aluminio) diferentes.

Es interesante señalar que, aunque se detectó un aumento de la IgEe a Pru p 3 en los ratones inmunizados con Pru p 3 y con Pru p 3 + LPS, el nivel fue significativamente más alto en este último que eran los anafilácticos, lo que sugiere un papel clave de la IgEe en la respuesta clínica. Este

hallazgo indica que los niveles de IgEe pueden ser un biomarcador para diferenciar la sensibilización de la alergia real, como ha sido propuesto por otros autores en estudios con pacientes [297, 298]. Además, el grupo anafiláctico, tratado con Pru p 3 + LPS, también mostró un aumento significativo de IgG1 específica a Pru p 3 que no se observó en ratones sensibilizados solo con Pru p 3. Con todo esto, es tentador especular que los altos niveles de IgEe junto con el aumento de IgG1 específica pueden estar relacionados con la aparición de síntomas anafilácticos, como se ha demostrado en pacientes con anafilaxia al melocotón y otros alérgenos [290, 299].

El uso de algunos adyuvantes puede comprometer la respuesta específica al alérgeno y, además, el tipo de respuesta. El LPS, por ejemplo, tiene un papel en el sistema inmune innato en el desarrollo de una respuesta Th1 [300] en la que están implicadas las células T CD8⁺. Sin embargo, en nuestro modelo, el uso de LPS en combinación con Pru p 3 no solo induce una respuesta específica de anticuerpos a Pru p 3, sino que también conduce a un patrón de respuesta Th2, confirmado por el aumento de anticuerpos IgE e IgG1 específicos, de células secretoras de IgE e IgG1 y niveles de IL-4 incrementados. Además, el análisis del fenotipo de células proliferativas mostró que la combinación de Pru p 3 + LPS indujo la activación específica frente a Prup 3 de los linfocitos T CD4⁺ y no se encontró respuesta proliferativa de las células T CD8⁺. Por otro lado, en el grupo de ratones sensibilizados solo con LPS no se observó respuesta proliferativa frente a Pru p 3. Estos resultados sugieren que la provocación con Pru p 3 de los ratones sensibilizados con Pru p 3 + LPS por vía nasal puede conducir a respuestas anafilácticas. Si bien la elección de la vía de administración del alérgeno es crítica para la generación de un modelo de alergia y aunque en el caso de la alergia al melocotón dicha sensibilización se ha asociado a vías oral y gastrointestinal, en modelos animales descritos hasta el momento, no se ha conseguido una respuesta anafiláctica, probablemente como consecuencia de los mecanismos de tolerancia asociados con estas rutas [301, 302]. Además, en el caso del Pru p 3, aparte de estas vías, también se ha demostrado la sensibilización por vía inhalatoria [103, 303].

El mecanismo por el cual la exposición a Pru p 3 + LPS puede provocar una respuesta adaptativa, que conduce a la inducción de IgE y células T CD4⁺ no está claro todavía, pero puede relacionarse con las características de las células dendríticas residentes y con la expresión diferencial de receptores innatos. Además, estudios anteriores han demostrado que las respuestas de tipo Th2 inducidas en el tracto gastrointestinal pueden influir en las respuestas inmunofisiológicas en tejido mucoso, no inflamado y regula la capacidad de respuesta de la vía aérea [304, 305]. La impronta de las células T vírgenes para convertirse en células Th2 específicas de proteínas requiere la activación del sistema inmune innato provocado por LPS [292, 306] que da lugar a la síntesis de IgE. La respuesta proliferativa de las células T CD4⁺ en presencia de Pru p 3 demuestra que los

resultados están mediados por la respuesta inmune adaptativa con células T específicas para el alérgeno y no por la respuesta inmune innata temprana a LPS.

Dichos resultados sugieren que el LPS junto con el Pru p 3 pueden estimular las células inmunes en el tracto respiratorio superior y desencadenar un estado de proinflamación generalizado. Hasta donde sabemos, este es el primer modelo eficaz de anafilaxia causada por Pru p 3. El uso de estos ratones anafilácticos muestra un gran potencial para probar y desarrollar nuevos enfoques de inmunoterapia para alérgenos alimentarios, con posibles aplicaciones a otras alergias.

La ITE con Pru p 3 es una estrategia prometedora para tratar a pacientes alérgicos a melocotón. Diversos estudios han demostrado la eficacia de la ITSL con extracto de melocotón enriquecido con Pru p 3, que incluye una reducción de las reacciones alérgicas sistémicas [201, 202]. Sin embargo, el desarrollo de vacunas para la inmunoterapia a gran escala y de bajo costo, utilizando extractos proteicos naturales como fuente de alérgenos, está fuertemente limitado por aspectos relacionados con la purificación, las variaciones en la concentración y las diferencias en la inmunogenicidad, que surgen de los diferentes procesos de preparación. Estos problemas pueden conducir a diferencias del producto final entre lotes; éstos se pueden superar utilizando péptidos de células T sintetizados que se pueden producir de manera eficiente y reproducible, evitando además otros problemas como la producción de reacciones alérgicas durante el tratamiento. En este sentido, se empezó a probar el uso de péptidos, por ejemplo para tratar la alergia al gato [307] que, aunque prometedor en los ensayos iniciales, no alcanzó los objetivos clínicos en la fase II [308]. Esto puede deberse a que estos péptidos solo pueden inducir respuestas inmunes débiles que necesitan reforzarse mediante la adición de un adyuvante. Estudios anteriores han demostrado que ODN-CpG, un ligando del TLR9, es útil para modificar la respuesta inmune Th2 hacia un equilibrio Th1/Treg en el tratamiento de la rinitis alérgica [249, 309], así como en la AA [252].

En este estudio hemos evaluado la inmunomodulación de la anafilaxia a Pru p 3 utilizando un nuevo sistema que incluye péptidos de Pru p 3 de células T presentados de forma monovalente (D1) o tetravalente (D4) y una molécula adyuvante (ODN-CpG) que se une al receptor TLR9 para inducir una modulación específica hacia una respuesta inmune Th1/Treg. Esta ITE induce una respuesta de tolerancia tras la provocación con el alérgeno que se observa *in vivo* por la falta de síntomas anafilácticos e *in vitro* por una disminución en la respuesta efectora Th2: IgE e IgG1 específicas de Pru p 3, respuesta proliferativa de células T CD4⁺ específicas y producción de IL-4; un aumento simultáneo de producción de IFN- γ e IL-10 y de células Treg. Estas observaciones son consistentes con las observadas previamente para ratones alérgicos al cacahuete, donde se administraron conjuntamente proteínas de cacahuete con ODN-CpG por vía oral [250, 252, 309, 310]. La ITE basada en el uso de nanopartículas ha sido previamente evaluada en AA,

concretamente en alergia a cacahuete, la cual ha logrado inducir protección contra la anafilaxia [251, 311].

En este trabajo hemos utilizado estructuras dendriméricas tanto monoméricas como tetravalentes para evaluar si la inclusión de epítomos repetidos en la misma estructura aumenta la respuesta inmune. Nuestros inmunógenos mono (D1) y tetravalentes (D4) son compuestos monodispersos y homogéneos, que se han caracterizado perfectamente por espectrometría de masas. Los estudios comparativos muestran que, aunque pueden observarse cambios inmunológicos después del tratamiento sublingual con ambos compuestos, D1 induce inmunoprotección contra la anafilaxia en el 80% de los ratones mientras que D4 induce protección solamente en el 30% de los ratones. La menor eficacia de D4 podría estar relacionada con la menor disminución de IgEe, falta de cambios en la producción de IgG1 específica, IFN- γ e IL-10 en comparación con el grupo anafiláctico sin tratar. Proponemos varias explicaciones de la falta de eficacia: **(i)** la capacidad de **penetración a través de la mucosa sublingual** está relacionada con el tamaño de los compuestos. El transporte de proteínas a través de la mucosa depende del tamaño (influido por la agregación), la polaridad y la forma. En este sentido, es importante mencionar que las nanopartículas menores de 200nm pueden atravesar las barreras linfáticas y ser absorbidas por las células dendríticas en los ganglios linfáticos induciendo respuestas Th1, como se ha demostrado utilizando partículas similares funcionalizadas con ODN-CpG [251]; **(ii)** además, el tamaño de la nanoestructura puede influir en la respuesta del sistema inmune por su **capacidad para ser captada por células presentadoras de antígenos**. Esto se ha demostrado previamente con *nanoclusters* de oro fluorescentes donde se ha observado que los compuestos más pequeños son captados más fácilmente por las células dendríticas mejorando las respuestas inmunosupresoras Th1 / Treg [312, 313]; **(iii)** la **capacidad de inducir el puenteo de IgE** también puede ser importante para mantener la respuesta efectora. Estimamos que la distancia máxima entre dos epítomos de Pru p 3 en la nanoestructura D4 es de aproximadamente 3 nm (30 Å), cercano a la distancia supuesta como óptima (44-51 Å) para el puenteo efectivo de IgE específica en basófilos de rata para estimular la degranulación [314]. Esto puede hacer que nuestra nanoestructura interactúe con las células efectoras, como los mastocitos y los basófilos (aunque subóptimamente), manteniendo una respuesta Th2 residual durante la ITSL, y contrarrestando el aumento de la respuesta Th1/Treg. En este sentido, hemos confirmado que solo D4, pero no D1, fue capaz de inducir la activación de basófilos de pacientes alérgicos a melocotón, lo que indica su capacidad de puentear IgE unida a la superficie de los basófilos.

Uno de los principales retos relacionados con la ITE para la AA es su capacidad de inducir tolerancia a largo plazo [315] sin embargo estudios previos con ITO o ITSL con alérgenos alimentarios solo indican la inducción de una protección transitoria o desensibilización [316]. Por

ejemplo, un estudio en ratones mostró que los efectos protectores se perdieron después de 2 semanas tras finalizar el tratamiento [273]. En nuestro estudio, hemos confirmado el mantenimiento de la tolerancia hasta tres semanas después de suspender la ITSL y, además, encontramos que los cambios inmunológicos son similares a los obtenidos una semana después del tratamiento.

Todo ello indica que esta aproximación terapéutica con péptidos de células T de Pru p 3 y ligando del TLR9 representa un buen enfoque para inducir tolerancia en ratones alérgicos al melocotón.

Además de los TLR, los receptores de lectina de tipo C representan otro objetivo potencial en las células presentadoras de antígenos que pueden mejorar la captación y presentación de diferentes compuestos modulando la respuesta inmunológica, como se ha demostrado usando nanopartículas de oro y glicodendrimeros [253, 268]. En enfermedades alérgicas, los alergoides conjugados con manano han demostrado aumentar la captación de alérgenos y ser capaces de inducir la producción de células reguladoras FoxP3⁺ [256, 317].

En este estudio hemos reunido estos elementos para crear un nuevo enfoque de ITSL para tratar la alergia al melocotón, en el que uno o cuatro péptidos de Prup 3 que actúan como epítopos de células T se combinan con dendrones que contienen moléculas de manosa en su estructura, D₁ManPrup3 o D₄ManPrup3. Además, se han probado diferentes concentraciones de los compuestos (1, 2 y 5nM) para valorar la más adecuada para el tratamiento. Los resultados sugieren que a pesar de que se indujo protección frente a Pru p 3 con la ITSL a 2 y 5 nM, la cantidad óptima de compuesto sería de 2 nM, ya que ésta indujo una respuesta protectora prolongada tras la finalización de la ITSL, es decir una respuesta de tolerancia. Además, se produjo una disminución tanto en los niveles como en el número de células productoras de IgE e IgG1 específicas de Pru p3, en la proliferación de esplenocitos CD4⁺ específicos de Pru p 3 y producción de IL-4, todo ello acompañado de un aumento de esplenocitos productores de IFN-γ e IL-10 y células Tregs.

Cuando se evalúa el efecto de la ITSL con estos glicodendropéptidos directamente en las CD observamos que el tratamiento con D₁ManPrup3 a 2 nM, induce una disminución significativa de IL-4, con un aumento paralelo de CD productoras de IFN-γ e IL-10. Esto sugiere que la ITSL además de inducir la presentación del alérgeno por las CD, las modula para producir moléculas de señalización específicas necesarias para inducir Tregs y así suprimir la respuesta Th2 [318]. En estudios anteriores se ha observado que los cambios en CD CD11c⁺CD103⁺ durante la ITE están relacionados con la inducción de células reguladoras FoxP3⁺ específicas de antígeno [319, 320]; sin embargo, aunque observamos aumentos en células FoxP3⁺, no se encontraron cambios significativos en CD CD11c⁺CD103⁺. Esta discrepancia podría deberse al hecho de que las células CD11c⁺CD103⁺ de diferentes ganglios linfáticos se analizaron juntas, dificultando la búsqueda de

cambios específicos en esta población. Por ello, serán necesarios estudios más específicos para identificar si nuestro sistema modifica solo un subconjunto de CD, es decir, los ganglios linfáticos submandibulares, los mesentéricos o ambos.

Como se mencionó anteriormente uno de los principales objetivos de la ITSL como tratamiento para la AA es la inducción de tolerancia sostenida tras la finalización del tratamiento. Cuando analizamos este efecto con los glicodendropéptidos de Pru p 3, encontramos que solo D₁ManPrup3 administrado a 2 nM indujo una tolerancia hasta cinco semanas después de suspender el tratamiento, en un 90% de los ratones. Dicha tolerancia fue confirmada a nivel inmunológico, ya que el perfil de los parámetros fue similar al obtenido una semana después de finalizar el tratamiento. Es importante destacar que, en nuestro modelo, a diferencia que en trabajos anteriores, esta tolerancia se logró sin la exposición continua al alérgeno, requisito que otros han propuesto para mantener el estado de no respuesta [321].

Con respecto a D₄ManPrup3 administrado a 2 nM, a diferencia de los resultados observados con la estructura tetramérica con CpG en el estudio previo, sí observamos efectos beneficiosos tanto *in vivo* como *in vitro* 1 semana después del tratamiento. Sin embargo, este efecto desapareció después de 5 semanas, lo que podría indicar que lo que se produce es una desensibilización en lugar de una tolerancia. Por tanto, en este segundo estudio se confirman los menores efectos del compuesto tetramérico, D₄ManPrup3, en comparación con el monomérico, D₁ManPrup3.

Un hallazgo interesante de este estudio fue la confirmación de que D₁ManPrup3 solo indujo un efecto beneficioso a largo plazo cuando se administró a 2 nM. Las concentraciones más altas (5nM), indujeron inicialmente un efecto protector, sin embargo, esto desapareció después de 5 semanas. Este efecto dosis-dependiente se ha observado previamente para ITE en un modelo murino de alergia a las gambas [284] y en 2 ensayos de ITE intranasal para rinitis y rinoconjuntivitis [322, 323]. Los efectos a largo plazo obtenidos con D₁ManPrup3 a 2nM se asociaron con la inducción de células Treg FoxP3⁺ y con la producción de IL-10, ambas consideradas esenciales en la inducción de tolerancia [187, 284, 324].

Con este estudio se ha demostrado que esta ITSL basada en un glicodendropéptido monomérico de Pru p 3 con moléculas de manosa en su estructura (D₁ManPrup3) induce protección, tal como se define por la ausencia de síntomas de anafilaxia contra el alérgeno Pru p 3. Esta tolerancia se asoció con una disminución de la respuesta Th2 (IgE, IgG1 e IL-4) y un incremento del patrón Th1/Treg (IFN- γ e IL-10). Además, se consiguió una protección sostenida a largo plazo, durante al menos 5 semanas después del tratamiento, sin la necesidad de mantener un contacto regular con el alérgeno. Por lo tanto, D₁ManPrup3 representa un nuevo y prometedor enfoque de inmunoterapia específica que no requiere adyuvantes adicionales y, además, el diseño molecular y la ruta química para acceder a la composición la hacen altamente versátil y potencialmente

adaptable a otros tipos de alérgenos para los cuales se conozcan los epítomos T inmunodominantes del determinante antigénico.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

CONCLUSIONES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. La respuesta anafiláctica específica de Pru p 3, demostrada *in vivo* por una caída de temperatura corporal significativa junto con la aparición de síntomas de anafilaxia y niveles elevados de inmunoglobulinas tipo Th2 (IgE e IgG1) puede generarse después de la sensibilización nasal a Pru p 3 en combinación con LPS como adyuvante.
2. Comparado con el grupo de ratones sensibilizados sin síntomas (solo con Pru p 3), el grupo de ratones anafilácticos (con Pru p 3 + LPS) muestra unos niveles significativamente más elevados de IgE e IgG1 específicas a Pru p 3, lo que sugiere un papel clave de estas inmunoglobulinas en la respuesta clínica pudiendo ser biomarcadores para diferenciar la sensibilización de la alergia real.
3. La ITSL específica basada en dendrímeros monoméricos con péptidos T de Pru p 3 administrada junto con CpG representa un buen enfoque para inducir tolerancia en ratones alérgicos al melocotón, por la disminución en la respuesta efectora de Th2 con una reducción de IgE e IgG1 específicas a Pru p 3, disminución en la respuesta proliferativa de células T CD4⁺ específicas y en la producción de IL-4 y un aumento simultáneo de células Treg y producción de IFN- γ e IL-10.
4. La ITSL específica basada en glicodendropéptidos de Pru p 3 (D_nManPrup3) es una aproximación innovadora y prometedora ya que induce tolerancia contra el alérgeno Pru p 3. Esta tolerancia se asocia con una disminución de la respuesta Th2 (IgE, IgG1 e IL-4) y un patrón Th1/Treg incrementado (IFN- γ e IL-10). La ventaja de estos glicodendropéptidos sobre los dendropéptidos reside en que el adyuvante está incorporado a la estructura y va a actuar sobre las dianas inmunológicas de forma simultánea al alérgeno.
5. La valencia y tamaño de las estructuras influyen significativamente en la inmunoprotección inducida contra la anafilaxia ya que las estructuras monovalentes protegen en el 80-90% de los ratones tratados mientras que las tetravalentes solo inducen protección en el 30% de los ratones tratados tanto a la semana como un periodo de tiempo tras finalizar el tratamiento. Dicho efecto diferencial podría deberse a la capacidad de penetración a nivel de mucosa, a la captación por las células presentadoras de antígenos como las células dendríticas y a la capacidad de puenteo de IgE específicas unidas a la superficie de células efectoras, mastocitos y basófilos.

CONCLUSIONES

6. D₁ManPrup3 administrado a 2 nM induce el mantenimiento de la tolerancia hasta cinco semanas después de suspender el tratamiento, con un 90% de los ratones sin síntomas anafilácticos tras la provocación y sin necesidad de una exposición continua al alérgeno. Por otra parte, D₁ManPrup3 administrado a 5 nM genera un efecto de desensibilización con una respuesta de protección transitoria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. 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 Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(6): p. 1105-18.
2. Sicherer, S.H. and H.A. Sampson, *Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(2): p. 291-307; quiz 308.
3. C, V.P., *Allergie*. Münch Med Wochenschr, 1906. **30**: p. 1457-1458.
4. De Weck, A., *Immunopathological mechanisms and clinical aspects of allergic reactions to drugs. Allergic reactions to drugs*. Handbook of Experimental Pharmacology, ed. B.H.B. Springer-Verlag. 1983.
5. Coombs PR, G.P., *Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease* In: Gell RR, editor. Clinical Aspects of Immunology. Oxford: Oxford University Press, 1968: p. 575-96.
6. Valenta, R., et al., *Food allergies: the basics*. Gastroenterology, 2015. **148**(6): p. 1120-31 e4.
7. Longo, G., et al., *IgE-mediated food allergy in children*. Lancet, 2013. **382**(9905): p. 1656-64.
8. Yunginger, J.W., et al., *Fatal food-induced anaphylaxis*. Jama, 1988. **260**(10): p. 1450-2.
9. Tang, M.L. and R.J. Mullins, *Food allergy: is prevalence increasing?* Intern Med J, 2017. **47**(3): p. 256-261.
10. de Silva, D., et al., *Acute and long-term management of food allergy: systematic review*. Allergy, 2014. **69**(2): p. 159-67.
11. Sicherer, S.H. and D.Y. Leung, *Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2014*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **135**(2): p. 357-67.
12. de Silva, I.L., et al., *Paediatric anaphylaxis: a 5 year retrospective review*. Allergy, 2008. **63**(8): p. 1071-6.
13. Ojeda, P., et al., *Alergologica 2015: A National Survey on Allergic Diseases in the Adult Spanish Population*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2018. **28**(3): p. 151-164.
14. 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, 2012. **42**(10): p. 1529-39.
15. Visness, C.M., et al., *Association of obesity with IgE levels and allergy symptoms in children and adolescents: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(5): p. 1163-9, 1169.e1-4.
16. Lack, G., *Update on risk factors for food allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(5): p. 1187-97.
17. Bock, S.A., A. Munoz-Furlong, and H.A. Sampson, *Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(4): p. 1016-8.
18. Jones, S.M. and A.W. Burks, *Food Allergy*. N Engl J Med, 2017. **377**(12): p. 1168-1176.
19. Abrams, E.M. and S.H. Sicherer, *Diagnosis and management of food allergy*. Cmaj, 2016. **188**(15): p. 1087-1093.
20. Sicherer, S.H. and H.A. Sampson, *Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment*. Annu Rev Med, 2009. **60**: p. 261-77.
21. Sicherer, S.H. and H.A. Sampson, *Food allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S116-25.
22. Sampson, H.A., et al., *Food allergy: a practice parameter update-2014*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **134**(5): p. 1016-25.e43.
23. Salvatore, S. and Y. Vandenplas, *Gastroesophageal reflux and cow milk allergy: is there a link?* Pediatrics, 2002. **110**(5): p. 972-84.
24. Ortolani, C., et al., *The oral allergy syndrome*. Ann Allergy, 1988. **61**(6 Pt 2): p. 47-52.

25. Osterballe, M., et al., *The clinical relevance of sensitization to pollen-related fruits and vegetables in unselected pollen-sensitized adults*. *Allergy*, 2005. **60**(2): p. 218-25.
26. Gomez, F., et al., *High prevalence of lipid transfer protein sensitization in apple allergic patients with systemic symptoms*. *PLoS One*, 2014. **9**(9): p. e107304.
27. Amlot, P.L., et al., *Oral allergy syndrome (OAS): symptoms of IgE-mediated hypersensitivity to foods*. *Clin Allergy*, 1987. **17**(1): p. 33-42.
28. Johansson, S.G., et al., *Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **113**(5): p. 832-6.
29. Vadas, P., B. Perelman, and G. Liss, *Platelet-activating factor, histamine, and tryptase levels in human anaphylaxis*. *J Allergy Clin Immunol*, 2013. **131**(1): p. 144-9.
30. Tole, J.W. and P. Lieberman, *Biphasic anaphylaxis: review of incidence, clinical predictors, and observation recommendations*. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2007. **27**(2): p. 309-26, viii.
31. Muraro, A., et al., *EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines. Food allergy health-related quality of life measures*. *Allergy*, 2014. **69**(7): p. 845-53.
32. Simons, F.E., *Anaphylaxis: Recent advances in assessment and treatment*. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. **124**(4): p. 625-36; quiz 637-8.
33. Zurzolo, G.A., et al., *Anaphylaxis to packaged foods in Australia*. *J Paediatr Child Health*, 2018.
34. Asero, R., et al., *Causes of food-induced anaphylaxis in Italian adults: a multi-centre study*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2009. **150**(3): p. 271-7.
35. Ruiter, B. and W.G. Shreffler, *The role of dendritic cells in food allergy*. *J Allergy Clin Immunol*, 2012. **129**(4): p. 921-8.
36. Akdis, M., K. Blaser, and C.A. Akdis, *T regulatory cells in allergy*. *Chem Immunol Allergy*, 2006. **91**: p. 159-73.
37. Akdis, M., *Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more*. *Curr Opin Immunol*, 2006. **18**(6): p. 738-44.
38. Vercelli, D., *Immunobiology of IgE*, in *Middleton's Allergy: Principles and Practice 7th Edition*. 2009, Elsevier. p. 1924.
39. Monticelli, S., L. De Monte, and D. Vercelli, *Molecular regulation of IgE switching: let's walk hand in hand*. *Allergy*, 1998. **53**(45 Suppl): p. 6-8.
40. Sutton, B.J. and H.J. Gould, *The human IgE network*. *Nature*, 1993. **366**(6454): p. 421-8.
41. Morafo, V., et al., *Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2-TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **111**(5): p. 1122-8.
42. Uersmosi, C., et al., *Mechanisms of allergen-specific desensitization*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **126**(2): p. 375-83.
43. Jutel, M. and C.A. Akdis, *Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy*. *Allergy*, 2011. **66**(6): p. 725-32.
44. Siraganian, R.P., *Mechanism of IgE-mediated hypersensitivity*, in *Middleton's Allergy: Principles and Practice*, E. Middleton, et al., Editors. 1988: Mosby: St. Louis. p. 105-134.
45. Akdis, M., et al., *Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases*. *J Allergy Clin Immunol*, 2011. **127**(3): p. 701-21 e1-70.
46. Akdis, C.A. and M. Akdis, *Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells*. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. **123**(4): p. 735-46; quiz 747-8.
47. Vickery, B.P., et al., *Mechanisms of immune tolerance relevant to food allergy*. *J Allergy Clin Immunol*, 2011. **127**(3): p. 576-84; quiz 585-6.
48. Kashyap, M., et al., *Cutting edge: CD4 T cell-mast cell interactions alter IgE receptor expression and signaling*. *J Immunol*, 2008. **180**(4): p. 2039-43.
49. Ring, S., et al., *CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue*. *Eur J Immunol*, 2006. **36**(11): p. 2981-92.

50. Meiler, F., et al., *Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors*. *Allergy*, 2008. **63**(11): p. 1455-63.
51. Sakaguchi, S., K. Wing, and T. Yamaguchi, *Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg*. *Eur J Immunol*, 2009. **39**(9): p. 2331-6.
52. Yamaguchi, T., J.B. Wing, and S. Sakaguchi, *Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions*. *Semin Immunol*, 2011. **23**(6): p. 424-30.
53. Burks, A.W., S. Laubach, and S.M. Jones, *Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment*. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. **121**(6): p. 1344-50.
54. Robinson, D.S., M. Larche, and S.R. Durham, *Tregs and allergic disease*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(10): p. 1389-97.
55. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. *J Immunol*, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
56. Baecher-Allan, C., E. Wolf, and D.A. Hafler, *Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+ CD25+ T cells*. *Clin Immunol*, 2005. **115**(1): p. 10-8.
57. Chatila, T.A., et al., *JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(12): p. R75-81.
58. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. *Nat Genet*, 2001. **27**(1): p. 20-1.
59. Torgerson, T.R., et al., *Severe food allergy as a variant of IPEX syndrome caused by a deletion in a noncoding region of the FOXP3 gene*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(5): p. 1705-17.
60. Balato, A., D. Unutmaz, and A.A. Gaspari, *Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions*. *J Invest Dermatol*, 2009. **129**(7): p. 1628-42.
61. Godfrey, D.I. and M. Kronenberg, *Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(10): p. 1379-88.
62. Romagnani, S., *Regulatory T cells: which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders?* *Allergy*, 2006. **61**(1): p. 3-14.
63. Roncarolo, M.G., et al., *Type 1 T regulatory cells*. *Immunol Rev*, 2001. **182**: p. 68-79.
64. Wood, R.A., *The natural history of food allergy*. *Pediatrics*, 2003. **111**(6 Pt 3): p. 1631-7.
65. Burks, A.W., et al., *ICON: food allergy*. *J Allergy Clin Immunol*, 2012. **129**(4): p. 906-20.
66. Peters, R.L., et al., *Natural history of peanut allergy and predictors of resolution in the first 4 years of life: A population-based assessment*. *J Allergy Clin Immunol*, 2015. **135**(5): p. 1257-66 e1-2.
67. Flicker, S. and R. Valenta, *Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2003. **132**(1): p. 13-24.
68. Fernandez-Rivas, M., *Fruit and vegetable allergy*. *Chem Immunol Allergy*, 2015. **101**: p. 162-70.
69. Worm, M., et al., *First European data from the network of severe allergic reactions (NORA)*. *Allergy*, 2014. **69**(10): p. 1397-404.
70. Thomas, W.R., B.J. Hales, and W.A. Smith, *Structural biology of allergens*. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2005. **5**(5): p. 388-93.
71. Pomes, A., *Intrinsic properties of allergens and environmental exposure as determinants of allergenicity*. *Allergy*, 2002. **57**(8): p. 673-9.
72. Shakib, F., A.M. Ghaemmaghami, and H.F. Sewell, *The molecular basis of allergenicity*. *Trends Immunol*, 2008. **29**(12): p. 633-42.
73. Flicker, S., et al., *A human monoclonal IgE antibody defines a highly allergenic fragment of the major timothy grass pollen allergen, Phl p 5: molecular, immunological, and structural characterization of the epitope-containing domain*. *J Immunol*, 2000. **165**(7): p. 3849-59.

74. Hsu, S.C., et al., *Functional interaction of common allergens and a C-type lectin receptor, dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN), on human dendritic cells.* J Biol Chem, 2010. **285**(11): p. 7903-10.
75. Kamalakannan, M., et al., *Identification and characterization of DC-SIGN-binding glycoproteins in allergenic foods.* Allergy, 2016. **71**(8): p. 1145-55.
76. Abul K. Abbas, A.H.H.L., Shiv Pillai, *Inmunología Celular Y Molecular - 8ª Edición* 2015: Saunders Elsevier.
77. Mori, L. and G. De Libero, *Presentation of lipid antigens to T cells.* Immunol Lett, 2008. **117**(1): p. 1-8.
78. Fernández Rivas M, B.B., Rodríguez R, Salcedo G. , *Alérgenos Alimentarios*, in *Tratado de Alergología SEAIC*. 1992.
79. Aalberse, R.C., *Structural biology of allergens.* J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(2): p. 228-38.
80. Guillermo Arturo Guidos F, V.M.A.A., *Polinosis y aeroalergenos.* Alergia, Asma e Inmunología pediátrica, 2005. **14**(2): p. 52-55.
81. Fernandez-Rivas, M., et al., *Allergies to fruits and vegetables.* Pediatr Allergy Immunol, 2008. **19**(8): p. 675-81.
82. Mari, A., *Multiple pollen sensitization: a molecular approach to the diagnosis.* Int Arch Allergy Immunol, 2001. **125**(1): p. 57-65.
83. Asero, R., R. Monsalve, and D. Barber, *Profilin sensitization detected in the office by skin prick test: a study of prevalence and clinical relevance of profilin as a plant food allergen.* Clin Exp Allergy, 2008. **38**(6): p. 1033-7.
84. Wopfner, N., et al., *Molecular and immunological characterization of profilin from mugwort pollen.* Biol Chem, 2002. **383**(11): p. 1779-89.
85. Burastero, S.E., et al., *T-cell receptor-mediated cross-allergenicity.* Int Arch Allergy Immunol, 2004. **135**(4): p. 296-305.
86. Burastero, S.E., *Pollen-cross allergenicity mediated by panallergens: a clue to the pathogenesis of multiple sensitizations.* Inflamm Allergy Drug Targets, 2006. **5**(4): p. 203-9.
87. Hauser, M., et al., *Panallergens and their impact on the allergic patient.* Allergy Asthma Clin Immunol, 2010. **6**(1): p. 1.
88. Breiteneder, H. and C. Ebner, *Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens.* J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(1 Pt 1): p. 27-36.
89. Breiteneder, H. and E.N. Mills, *Molecular properties of food allergens.* J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(1): p. 14-23; quiz 24.
90. Douliez, J.P., T. Michon, and D. Marion, *Steady-state tyrosine fluorescence to study the lipid-binding properties of a wheat non-specific lipid-transfer protein (nsLTP1).* Biochim Biophys Acta, 2000. **1467**(1): p. 65-72.
91. Fernandez-Rivas, M. and M. Cuevas, *Peels of Rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps.* Clin Exp Allergy, 1999. **29**(9): p. 1239-47.
92. Fernandez-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, 2003. **112**(4): p. 789-95.
93. Salcedo, G., et al., *Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1771**(6): p. 781-91.
94. Diaz-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, 2000. **30**(10): p. 1403-10.
95. Lauer, I., et al., *Identification of a plane pollen lipid transfer protein (Pla a 3) and its immunological relation to the peach lipid-transfer protein, Pru p 3.* Clin Exp Allergy, 2007. **37**(2): p. 261-9.
96. Ayuso, R., J. Carreira, and F. Polo, *Quantitation of the major allergen of several Parietaria pollens by an anti-Par 1 monoclonal antibody-based ELISA. Analysis of crossreactivity*

- among purified Par j 1, Par o 1 and Par m 1 allergens. *Clin Exp Allergy*, 1995. **25**(10): p. 993-9.
97. Tejera, M.L., et al., *Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen*. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. **104**(4 Pt 1): p. 797-802.
 98. Pastorello, E.A., et al., *Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **111**(2): p. 350-9.
 99. Brenna, O., et al., *Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar*. *J Agric Food Chem*, 2000. **48**(2): p. 493-7.
 100. Asero, R., et al., *Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2000. **122**(1): p. 20-32.
 101. Zuidmeer, L. and R. van Ree, *Lipid transfer protein allergy: primary food allergy or pollen/food syndrome in some cases*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2007. **7**(3): p. 269-73.
 102. Garcia, B.E., et al., *Respiratory allergy to peach leaves and lipid-transfer proteins*. *Clin Exp Allergy*, 2004. **34**(2): p. 291-5.
 103. Palacin, A., et al., *Wheat lipid transfer protein is a major allergen associated with baker's asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. **120**(5): p. 1132-8.
 104. 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*, 2009. **39**(11): p. 1764-73.
 105. Pastorello, E.A., et al., *The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein*. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. **103**(3 Pt 1): p. 520-6.
 106. Sanchez-Monge, R., et al., *Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy*. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. **103**(3 Pt 1): p. 514-9.
 107. Scheurer, S., et al., *Recombinant allergens Pru av 1 and Pru av 4 and a newly identified lipid transfer protein in the in vitro diagnosis of cherry allergy*. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. **107**(4): p. 724-31.
 108. Pastorello, E.A., et al., *Characterization of the major allergen of plum as a lipid transfer protein*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001. **756**(1-2): p. 95-103.
 109. Pastorello, E.A., et al., *Evidence for a lipid transfer protein as the major allergen of apricot*. *J Allergy Clin Immunol*, 2000. **105**(2 Pt 1): p. 371-7.
 110. Pastorello, E.A., et al., *Clinical role of a lipid transfer protein that acts as a new apple-specific allergen*. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. **104**(5): p. 1099-106.
 111. Pastorello, E.A., et al., *Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results*. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. **109**(3): p. 563-70.
 112. Pastorello, E.A., et al., *Lipid transfer protein and vicilin are important walnut allergens in patients not allergic to pollen*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **114**(4): p. 908-14.
 113. Pastorello, E.A., et al., *The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein*. *J Allergy Clin Immunol*, 2000. **106**(4): p. 744-51.
 114. Diaz-Perales, A., et al., *Characterization of asparagus allergens: a relevant role of lipid transfer proteins*. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. **110**(5): p. 790-6.
 115. San Miguel-Moncin, M., et al., *Lettuce anaphylaxis: identification of a lipid transfer protein as the major allergen*. *Allergy*, 2003. **58**(6): p. 511-7.
 116. Pastorello, E.A., et al., *Allergenic cross-reactivity among peach, apricot, plum, and cherry in patients with oral allergy syndrome: an in vivo and in vitro study*. *J Allergy Clin Immunol*, 1994. **94**(4): p. 699-707.
 117. Asero, R., et al., *Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study*. *Allergy*, 2002. **57**(10): p. 900-6.
 118. 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*, 2003. **112**(4): p. 775-83.
119. Palacin, A., et al., *Characterization of peach thaumatin-like proteins and their identification as major peach allergens*. *Clin Exp Allergy*, 2010. **40**(9): p. 1422-30.
 120. Hartz, C., et al., *Comparison of IgE-binding capacity, cross-reactivity and biological potency of allergenic non-specific lipid transfer proteins from peach, cherry and hazelnut*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2010. **153**(4): p. 335-46.
 121. Cuesta-Herranz, J., et al., *Peach allergy pattern: experience in 70 patients*. *Allergy*, 1998. **53**(1): p. 78-82.
 122. Asero, R., et al., *Are IgE levels to foods other than rosaceae predictive of allergy in lipid transfer protein-hypersensitive patients?* *Int Arch Allergy Immunol*, 2011. **155**(2): p. 149-54.
 123. van Ree, R., *Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens*. *Biochem Soc Trans*, 2002. **30**(Pt 6): p. 910-3.
 124. Diaz-Perales, A., et al., *Recombinant Pru p 3 and natural Pru p 3, a major peach allergen, show equivalent immunologic reactivity: a new tool for the diagnosis of fruit allergy*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **111**(3): p. 628-33.
 125. Garcia-Casado, G., et al., *Identification of IgE-binding epitopes of the major peach allergen Pru p 3*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **112**(3): p. 599-605.
 126. Pacios, L.F., et al., *Mimotope mapping as a complementary strategy to define allergen IgE-epitopes: peach Pru p 3 allergen as a model*. *Mol Immunol*, 2008. **45**(8): p. 2269-76.
 127. Tordesillas, L., et al., *T-cell epitopes of the major peach allergen, Pru p 3: Identification and differential T-cell response of peach-allergic and non-allergic subjects*. *Mol Immunol*, 2009. **46**(4): p. 722-8.
 128. Hamilton, R.G., *Clinical laboratory assessment of immediate-type hypersensitivity*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S284-96.
 129. Kattan, J.D. and S.H. Sicherer, *Optimizing the diagnosis of food allergy*. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2015. **35**(1): p. 61-76.
 130. Lieberman, J.A. and S.H. Sicherer, *Diagnosis of food allergy: epicutaneous skin tests, in vitro tests, and oral food challenge*. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2011. **11**(1): p. 58-64.
 131. Sampson, H.A., K.R. Broadbent, and J. Bernhisel-Broadbent, *Spontaneous release of histamine from basophils and histamine-releasing factor in patients with atopic dermatitis and food hypersensitivity*. *N Engl J Med*, 1989. **321**(4): p. 228-32.
 132. Gomez, E., et al., *Immunoglobulin E-mediated immediate allergic reactions to dipyrone: value of basophil activation test in the identification of patients*. *Clin Exp Allergy*, 2009. **39**(8): p. 1217-24.
 133. 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*, 2015. **135**(1): p. 179-86.
 134. Hoffmann, H.J., et al., *The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease*. *Allergy*, 2015. **70**(11): p. 1393-405.
 135. Perry, T.T., et al., *Risk of oral food challenges*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **114**(5): p. 1164-8.
 136. Brough, H.A., et al., *Dietary management of peanut and tree nut allergy: what exactly should patients avoid?* *Clin Exp Allergy*, 2015. **45**(5): p. 859-871.
 137. Groetch, M. and A. Nowak-Wegrzyn, *Practical approach to nutrition and dietary intervention in pediatric food allergy*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2013. **24**(3): p. 212-21.
 138. Yu, J.W., et al., *Accidental ingestions in children with peanut allergy*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **118**(2): p. 466-72.
 139. Fleming, J.T., et al., *Early treatment of food-induced anaphylaxis with epinephrine is associated with a lower risk of hospitalization*. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2015. **3**(1): p. 57-62.

140. Simons, F.E., et al., *2015 update of the evidence base: World Allergy Organization anaphylaxis guidelines*. World Allergy Organ J, 2015. **8**(1): p. 32.
141. Campbell, R.L., et al., *Epinephrine in anaphylaxis: higher risk of cardiovascular complications and overdose after administration of intravenous bolus epinephrine compared with intramuscular epinephrine*. J Allergy Clin Immunol Pract, 2015. **3**(1): p. 76-80.
142. Akdis, C.A. and M. Akdis, *Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens*. World Allergy Organ J, 2015. **8**(1): p. 17.
143. Jones, S.M., et al., *Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(2): p. 292-300, 300 e1-97.
144. Kim, E.H., et al., *Sublingual immunotherapy for peanut allergy: clinical and immunologic evidence of desensitization*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(3): p. 640-6 e1.
145. Wai, C.Y.Y., et al., *Immunotherapy of Food Allergy: a Comprehensive Review*. Clin Rev Allergy Immunol, 2017.
146. Woo, H.Y., et al., *Mechanism for acute oral desensitization to antibiotics*. Allergy, 2006. **61**(8): p. 954-8.
147. Eberlein-Konig, B., et al., *Tryptase and histamine release due to a sting challenge in bee venom allergic patients treated successfully or unsuccessfully with hyposensitization*. Clin Exp Allergy, 1995. **25**(8): p. 704-12.
148. Jutel, M., et al., *International consensus on allergy immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **136**(3): p. 556-68.
149. Akdis, C.A. and M. Akdis, *Mechanisms of allergen-specific immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(1): p. 18-27; quiz 28-9.
150. Muller, U., et al., *Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **101**(6 Pt 1): p. 747-54.
151. Suarez-Fueyo, A., et al., *Grass tablet sublingual immunotherapy downregulates the TH2 cytokine response followed by regulatory T-cell generation*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(1): p. 130-8 e1-2.
152. Gonzalez, M., et al., *Dermatophagoides pteronyssinus immunotherapy changes the T-regulatory cell activity*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 11949.
153. Palomares, F., et al., *Immunological Changes Induced in Peach Allergy Patients with Systemic Reactions by Pru p 3 Sublingual Immunotherapy*. Mol Nutr Food Res, 2018. **62**(3).
154. Kitzmuller, C., et al., *Sublingual immunotherapy with recombinant Mal d 1 downregulates the allergen-specific Th2 response*. Allergy, 2019.
155. Gleich, G.J., et al., *Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six-year prospective study*. J Allergy Clin Immunol, 1982. **70**(4): p. 261-71.
156. Uermosi, C., et al., *IgG-mediated down-regulation of IgE bound to mast cells: a potential novel mechanism of allergen-specific desensitization*. Allergy, 2014. **69**(3): p. 338-47.
157. Strait, R.T., S.C. Morris, and F.D. Finkelman, *IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and Fc gamma RIIB cross-linking*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 833-41.
158. Jutel, M., et al., *IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy*. Eur J Immunol, 2003. **33**(5): p. 1205-14.
159. Noon, L., *Prophylactic inoculation against hay fever. Historical document*. Ann Allergy, 1960. **18**: p. 287-91.
160. Reisacher, W.R. and W. Davison, *Immunotherapy for food allergy*. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2017. **25**(3): p. 235-241.
161. Reisacher, W.R. and T. Schwanke, *New advances in allergy immunotherapy*. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2016. **24**(3): p. 231-7.

162. Maggi, E., *T-cell responses induced by allergen-specific immunotherapy*. Clin Exp Immunol, 2010. **161**(1): p. 10-8.
163. Seiberling, K., et al., *Cost of allergy immunotherapy: sublingual vs subcutaneous administration*. Int Forum Allergy Rhinol, 2012. **2**(6): p. 460-4.
164. Allam, J.P., et al., *Phl p 5 resorption in human oral mucosa leads to dose-dependent and time-dependent allergen binding by oral mucosal Langerhans cells, attenuates their maturation, and enhances their migratory and TGF-beta1 and IL-10-producing properties*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(3): p. 638-45 e1.
165. Allam, J.P., et al., *Distribution of Langerhans cells and mast cells within the human oral mucosa: new application sites of allergens in sublingual immunotherapy?* Allergy, 2008. **63**(6): p. 720-7.
166. Anagnostou, K. and A. Clark, *Oral Immunotherapy for Peanut Allergy*. Annu Rev Med, 2016. **67**: p. 375-85.
167. Pajno, G.B., et al., *Oral immunotherapy for cow's milk allergy with a weekly up-dosing regimen: a randomized single-blind controlled study*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2010. **105**(5): p. 376-81.
168. Skripak, J.M., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(6): p. 1154-60.
169. 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, 2015. **135**(5): p. 1275-1282 e6.
170. Narisety, S.D. and C.A. Keet, *Sublingual vs oral immunotherapy for food allergy: identifying the right approach*. Drugs, 2012. **72**(15): p. 1977-89.
171. Keet, C.A., et al., *Long-term follow-up of oral immunotherapy for cow's milk allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **132**(3): p. 737-739 e6.
172. Burks, A.W., et al., *Oral immunotherapy for treatment of egg allergy in children*. N Engl J Med, 2012. **367**(3): p. 233-43.
173. Caminiti, L., et al., *Oral Immunotherapy for Egg Allergy: A Double-Blind Placebo-Controlled Study, with Postdesensitization Follow-Up*. J Allergy Clin Immunol Pract, 2015. **3**(4): p. 532-9.
174. Anagnostou, K., et al., *Assessing the efficacy of oral immunotherapy for the desensitisation of peanut allergy in children (STOP II): a phase 2 randomised controlled trial*. Lancet, 2014. **383**(9925): p. 1297-304.
175. Moran, T.P. and A.W. Burks, *Is clinical tolerance possible after allergen immunotherapy?* Curr Allergy Asthma Rep, 2015. **15**(5): p. 23.
176. Moran, T.P., B.P. Vickery, and A.W. Burks, *Oral and sublingual immunotherapy for food allergy: current progress and future directions*. Curr Opin Immunol, 2013. **25**(6): p. 781-7.
177. Lucendo, A.J., A. Arias, and J.M. Tenias, *Relation between eosinophilic esophagitis and oral immunotherapy for food allergy: a systematic review with meta-analysis*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2014. **113**(6): p. 624-9.
178. Leonard, S.A., *Baked Egg and Milk Exposure as Immunotherapy in Food Allergy*. Curr Allergy Asthma Rep, 2016. **16**(4): p. 32.
179. Nadeau, K.C., et al., *Rapid oral desensitization in combination with omalizumab therapy in patients with cow's milk allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(6): p. 1622-4.
180. Senti, G. and T.M. Kundig, *Novel Delivery Routes for Allergy Immunotherapy: Intralymphatic, Epicutaneous, and Intradermal*. Immunol Allergy Clin North Am, 2016. **36**(1): p. 25-37.
181. Wang, J. and H.A. Sampson, *Safety and efficacy of epicutaneous immunotherapy for food allergy*. Pediatr Allergy Immunol, 2018.
182. Mondoulet, L., et al., *Epicutaneous immunotherapy for food allergy as a novel pathway for oral tolerance induction*. Immunotherapy, 2015. **7**(12): p. 1293-305.

183. Mondoulet, L., et al., *Intact skin and not stripped skin is crucial for the safety and efficacy of peanut epicutaneous immunotherapy (EPIT) in mice*. Clin Transl Allergy, 2012. **2**(1): p. 22.
184. Senti, G., et al., *Epicutaneous allergen administration as a novel method of allergen-specific immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(5): p. 997-1002.
185. Gomez de Agüero, M., et al., *Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8(+) T cells and activating Foxp3(+) regulatory T cells*. J Clin Invest, 2012. **122**(5): p. 1700-11.
186. Shklovskaya, E., et al., *Langerhans cells are precommitted to immune tolerance induction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(44): p. 18049-54.
187. 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, 2016. **13**: p. 1-13.
188. 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, 2011. **186**(10): p. 5629-37.
189. Tordesillas, L., et al., *Epicutaneous immunotherapy induces gastrointestinal LAP(+) regulatory T cells and prevents food-induced anaphylaxis*. J Allergy Clin Immunol, 2017. **139**(1): p. 189-201 e4.
190. Dupont, C., et al., *Cow's milk epicutaneous immunotherapy in children: a pilot trial of safety, acceptability, and impact on allergic reactivity*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(5): p. 1165-7.
191. Scadding, G.K. and J. Brostoff, *Low dose sublingual therapy in patients with allergic rhinitis due to house dust mite*. Clin Allergy, 1986. **16**(5): p. 483-91.
192. Bousquet, J., R. Lockey, and H.J. Malling, *Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **102**(4 Pt 1): p. 558-62.
193. Mempel, M., et al., *Severe anaphylaxis to kiwi fruit: Immunologic changes related to successful sublingual allergen immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(6): p. 1406-9.
194. Sikora, J.M. and M.S. Tankersley, *Perception and practice of sublingual immunotherapy among practicing allergists in the United States: a follow-up survey*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2013. **110**(3): p. 194-197 e4.
195. Linkov, G. and E. Toskala, *Sublingual immunotherapy: what we can learn from the European experience*. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2014. **22**(3): p. 208-10.
196. Moingeon, P. and L. Mascarell, *Differences and similarities between sublingual immunotherapy of allergy and oral tolerance*. Semin Immunol, 2017. **30**: p. 52-60.
197. Bagnasco, M., et al., *Absorption and distribution kinetics of the major Parietaria judaica allergen (Par j 1) administered by noninjectable routes in healthy human beings*. J Allergy Clin Immunol, 1997. **100**(1): p. 122-9.
198. Cox, L., *Sublingual immunotherapy and allergic rhinitis*. Curr Allergy Asthma Rep, 2008. **8**(2): p. 102-10.
199. Enrique, E., et al., *Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study with a standardized hazelnut extract*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(5): p. 1073-9.
200. Keet, C.A., et al., *The safety and efficacy of sublingual and oral immunotherapy for milk allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(2): p. 448-55, 455 e1-5.
201. Fernandez-Rivas, M., et al., *Randomized double-blind, placebo-controlled trial of sublingual immunotherapy with a Pru p 3 quantified peach extract*. Allergy, 2009. **64**(6): p. 876-83.
202. Garcia, B.E., et al., *Sublingual immunotherapy in peach allergy: monitoring molecular sensitizations and reactivity to apple fruit and Platanus pollen*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2010. **20**(6): p. 514-20.

203. 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, 2017. **47**(3): p. 339-350.
204. Fleischer, D.M., et al., *Sublingual immunotherapy for peanut allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(1): p. 119-27 e1-7.
205. Chin, S.J., et al., *Sublingual versus oral immunotherapy for peanut-allergic children: a retrospective comparison*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **132**(2): p. 476-8 e2.
206. Le, U.H. and A.W. Burks, *Oral and sublingual immunotherapy for food allergy*. World Allergy Organ J, 2014. **7**(1): p. 35.
207. Chinthrajah, R.S., et al., *Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **137**(4): p. 984-97.
208. Valenta, R., et al., *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, 2016. **137**(2): p. 351-7.
209. Satitsuksanoa, P., et al., *Modified Allergens for Immunotherapy*. Curr Allergy Asthma Rep, 2018. **18**(2): p. 9.
210. Toda, M., et al., *Protein unfolding strongly modulates the allergenicity and immunogenicity of Pru p 3, the major peach allergen*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(5): p. 1022-30 e1-7.
211. Bencharitiwong, R., et al., *Effect of chemical modifications on allergenic potency of peanut proteins*. Allergy Asthma Proc, 2015. **36**(3): p. 185-91.
212. Bolhaar, S.T., et al., *A mutant of the major apple allergen, Mal d 1, demonstrating hypo-allergenicity in the target organ by double-blind placebo-controlled food challenge*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(12): p. 1638-44.
213. Niederberger, V., et al., *Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101 Suppl 2**: p. 14677-82.
214. Yang, Z., et al., *Synthesis of hypoallergenic derivatives of the major allergen Fag t 1 from tartary buckwheat via sequence restructuring*. Food Chem Toxicol, 2012. **50**(8): p. 2675-80.
215. Gomez-Casado, C., et al., *Allergenic characterization of new mutant forms of Pru p 3 as new immunotherapy vaccines*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 385615.
216. Reese, G., et al., *Allergenicity and antigenicity of wild-type and mutant, monomeric, and dimeric carrot major allergen Dau c 1: destruction of conformation, not oligomerization, is the roadmap to save allergen vaccines*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(4): p. 944-51.
217. Starkl, P., et al., *An unfolded variant of the major peanut allergen Ara h 2 with decreased anaphylactic potential*. Clin Exp Allergy, 2012. **42**(12): p. 1801-12.
218. Valenta, R., et al., *From allergen genes to allergy vaccines*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 211-41.
219. Hofer, H., et al., *Tackling Bet v 1 and associated food allergies with a single hybrid protein*. J Allergy Clin Immunol, 2017. **140**(2): p. 525-533 e10.
220. Zuidmeer-Jongejan, L., et al., *Development of a hypoallergenic recombinant parvalbumin for first-in-man subcutaneous immunotherapy of fish allergy*. Int Arch Allergy Immunol, 2015. **166**(1): p. 41-51.
221. Tsai, W.C., et al., *Cloning, expression, and purification of recombinant major mango allergen Man i 1 in Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 2017. **130**: p. 35-43.
222. 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, 2013. **68**(6): p. 803-8.
223. Mascheri, A., et al., *Hypersensitivity to Tomato (Lycopersicon esculentum) in Peach-Allergic Patients: rPrup 3 and rPrup 1 Are Predictive of Symptom Severity*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2015. **25**(3): p. 183-9.

224. Gadermaier, E., et al., *Recombinant allergen-based monitoring of antibody responses during injection grass pollen immunotherapy and after 5 years of discontinuation*. *Allergy*, 2011. **66**(9): p. 1174-82.
225. Gupta, K., et al., *Peptide based immunotherapy: a pivotal tool for allergy treatment*. *Int Immunopharmacol*, 2014. **19**(2): p. 391-8.
226. Moldaver, D. and M. Larche, *Immunotherapy with peptides*. *Allergy*, 2011. **66**(6): p. 784-91.
227. Tanabe, S., *Epitope peptides and immunotherapy*. *Curr Protein Pept Sci*, 2007. **8**(1): p. 109-18.
228. van Neerven, R.J., et al., *Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation*. *J Immunol*, 1999. **163**(5): p. 2944-52.
229. Wachholz, P.A. and S.R. Durham, *Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2004. **4**(4): p. 313-8.
230. Reche, P.A., et al., *Peptide-based immunotherapeutics and vaccines*. *J Immunol Res*, 2014. **2014**: p. 256784.
231. Pascal, M., et al., *In silico prediction of Ara h 2 T cell epitopes in peanut-allergic children*. *Clin Exp Allergy*, 2013. **43**(1): p. 116-27.
232. Prickett, S.R., et al., *Ara h 2 peptides containing dominant CD4+ T-cell epitopes: candidates for a peanut allergy therapeutic*. *J Allergy Clin Immunol*, 2011. **127**(3): p. 608-15 e1-5.
233. Prickett, S.R., et al., *Ara h 1 CD4+ T cell epitope-based peptides: candidates for a peanut allergy therapeutic*. *Clin Exp Allergy*, 2013. **43**(6): p. 684-97.
234. Meulenbroek, L.A., et al., *Oral treatment with beta-lactoglobulin peptides prevents clinical symptoms in a mouse model for cow's milk allergy*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2013. **24**(7): p. 656-64.
235. Pastorello, E.A., et al., *Characterization of the T-cell epitopes of the major peach allergen Pru p 3*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2010. **153**(1): p. 1-12.
236. Pfaar, O., et al., *Adjuvants for immunotherapy*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2012. **12**(6): p. 648-57.
237. Nouri, H.R., et al., *Induction of a Th1 immune response and suppression of IgE via immunotherapy with a recombinant hybrid molecule encapsulated in liposome-protamine-DNA nanoparticles in a model of experimental allergy*. *Immunol Res*, 2015. **62**(3): p. 280-91.
238. Jensen-Jarolim, E., *Aluminium in Allergies and Allergen immunotherapy*. *World Allergy Organ J*, 2015. **8**(1): p. 7.
239. Lutz, M.B. and G. Schuler, *Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?* *Trends Immunol*, 2002. **23**(9): p. 445-9.
240. Gomez, E., et al., *Effect of Pru p 3 on dendritic cell maturation and T-lymphocyte proliferation in peach allergic patients*. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2012. **109**(1): p. 52-8.
241. Tseng, S.Y., et al., *B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells*. *J Exp Med*, 2001. **193**(7): p. 839-46.
242. Sanchez-Quintero, M.J., et al., *Synergistic effect between amoxicillin and TLR ligands on dendritic cells from amoxicillin-delayed allergic patients*. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e74198.
243. McAleer, J.P. and A.T. Vella, *Educating CD4 T cells with vaccine adjuvants: lessons from lipopolysaccharide*. *Trends Immunol*, 2010. **31**(11): p. 429-35.
244. Aryan, Z. and N. Rezaei, *Toll-like receptors as targets for allergen immunotherapy*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2015. **15**(6): p. 568-74.
245. Aryan, Z., et al., *A new era of targeting the ancient gatekeepers of the immune system: toll-like agonists in the treatment of allergic rhinitis and asthma*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2014. **164**(1): p. 46-63.

246. Hedayat, M., K. Takeda, and N. Rezaei, *Prophylactic and therapeutic implications of toll-like receptor ligands*. Med Res Rev, 2012. **32**(2): p. 294-325.
247. Kline, J.N., et al., *Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(1): p. L170-9.
248. Simons, F.E., et al., *Selective immune redirection in humans with ragweed allergy by injecting Amb a 1 linked to immunostimulatory DNA*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(6): p. 1144-51.
249. Suzuki, M., et al., *Immunotherapy with CpG DNA conjugated with T-cell epitope peptide of an allergenic Cry j 2 protein is useful for control of allergic conditions in mice*. Int Immunopharmacol, 2007. **7**(1): p. 46-54.
250. Zhu, F.G., et al., *Oral administration of a synthetic agonist of Toll-like receptor 9 potently modulates peanut-induced allergy in mice*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(3): p. 631-7.
251. 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, 2016. **138**(2): p. 536-543 e4.
252. Pali-Scholl, I., et al., *Protamine nanoparticles with CpG-oligodeoxynucleotide prevent an allergen-induced Th2-response in BALB/c mice*. Eur J Pharm Biopharm, 2013. **85**(3 Pt A): p. 656-64.
253. Le Guevel, X., et al., *Multivalent Glycosylation of Fluorescent Gold Nanoclusters Promotes Increased Human Dendritic Cell Targeting via Multiple Endocytic Pathways*. ACS Appl Mater Interfaces, 2015. **7**(37): p. 20945-56.
254. 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, 2019: p. e1900553.
255. Sirvent, S., et al., *Novel vaccines targeting dendritic cells by coupling allergoids to nonoxidized mannan enhance allergen uptake and induce functional regulatory T cells through programmed death ligand 1*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **138**(2): p. 558-567.e11.
256. Schulke, S. and S. Vieths, *Dendritic cell targeting with C-type lectins for improvement of allergen immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **138**(2): p. 568-70.
257. Gringhuis, S.I., et al., *Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk*. Nat Immunol, 2009. **10**(2): p. 203-13.
258. Geijtenbeek, T.B. and S.I. Gringhuis, *Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(7): p. 465-79.
259. den Dunnen, J., S.I. Gringhuis, and T.B. Geijtenbeek, *Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(7): p. 1149-57.
260. Geijtenbeek, T.B. and S.I. Gringhuis, *C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(7): p. 433-48.
261. Geijtenbeek, T.B., J. den Dunnen, and S.I. Gringhuis, *Pathogen recognition by DC-SIGN shapes adaptive immunity*. Future Microbiol, 2009. **4**(7): p. 879-90.
262. Sah, H. and Y.W. Chien, *Prolonged immune response evoked by a single subcutaneous injection of microcapsules having a monophasic antigen release*. J Pharm Pharmacol, 1996. **48**(1): p. 32-6.
263. Reisacher, W.R., et al., *Desensitizing mice to ovalbumin through subcutaneous microsphere immunotherapy (SMITH)*. Int Forum Allergy Rhinol, 2011. **1**(5): p. 390-5.
264. Scholl, I., et al., *Allergen-loaded biodegradable poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid nanoparticles down-regulate an ongoing Th2 response in the BALB/c mouse model*. Clin Exp Allergy, 2004. **34**(2): p. 315-21.
265. Broos, S., et al., *Immunomodulatory nanoparticles as adjuvants and allergen-delivery system to human dendritic cells: Implications for specific immunotherapy*. Vaccine, 2010. **28**(31): p. 5075-85.

266. Reboucas Jde, S., et al., *Development of poly(anhydride) nanoparticles loaded with peanut proteins: the influence of preparation method on the immunogenic properties*. Eur J Pharm Biopharm, 2012. **82**(2): p. 241-9.
267. Lee, C.C., et al., *Designing dendrimers for biological applications*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(12): p. 1517-26.
268. Mascaraque A, K.W., Fernández T, Palomares F, Mayorga C, Andreu D, Rojo J, *Glycodendropeptides stimulate dendritic cell maturation and T cell proliferation: a potential influenza A virus immunotherapy*. MedChemComm, 2015. **6**: p. 1755-1760.
269. Ribeiro-Viana, R., et al., *BODIPY-labeled DC-SIGN-targeting glycodendrons efficiently internalize and route to lysosomes in human dendritic cells*. Biomacromolecules, 2012. **13**(10): p. 3209-19.
270. Rolland, J.M., L.M. Gardner, and R.E. O'Hehir, *Allergen-related approaches to immunotherapy*. Pharmacol Ther, 2009. **121**(3): p. 273-84.
271. Blumchen, K., et al., *Oral peanut immunotherapy in children with peanut anaphylaxis*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(1): p. 83-91 e1.
272. Oyoshi, M.K., et al., *Food allergy: Insights into etiology, prevention, and treatment provided by murine models*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(2): p. 309-17.
273. Leonard, S.A., et al., *Oral immunotherapy induces local protective mechanisms in the gastrointestinal mucosa*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(6): p. 1579-1587 e1.
274. Yamaki, K. and S. Yoshino, *Tyrosine kinase inhibitor sunitinib relieves systemic and oral antigen-induced anaphylaxes in mice*. Allergy, 2012. **67**(1): p. 114-22.
275. Srivastava, K.D., et al., *Efficacy and immunological actions of FAHF-2 in a murine model of multiple food allergies*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2012. **108**(5): p. 351-358 e1.
276. Aldemir, H., R. Bars, and C. Herouet-Guichenev, *Murine models for evaluating the allergenicity of novel proteins and foods*. Regul Toxicol Pharmacol, 2009. **54**(3 Suppl): p. S52-7.
277. Van Gramberg, J.L., et al., *Use of animal models to investigate major allergens associated with food allergy*. J Allergy (Cairo), 2013. **2013**: p. 635695.
278. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. 1986. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 5-14.
279. Romagnani, S., *Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more*. Immunol Today, 1991. **12**(8): p. 256-7.
280. Ovary, Z., N.M. Vaz, and N.L. Warner, *Passive anaphylaxis in mice with gamma-G antibodies. V. Competitive effects of different immunoglobulins and inhibition of reactions with antiglobulin sera*. Immunology, 1970. **19**(5): p. 715-27.
281. Ovary, Z., *New discoveries in immunological understanding of disease processes*. Proc Rudolf Virchow Med Soc City N Y, 1970. **28**: p. 138-44.
282. Bailon, E., et al., *A shorter and more specific oral sensitization-based experimental model of food allergy in mice*. J Immunol Methods, 2012. **381**(1-2): p. 41-9.
283. Li, X.M., et al., *A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **103**(2 Pt 1): p. 206-14.
284. Leung, N.Y.H., et al., *Low-Dose Allergen-Specific Immunotherapy Induces Tolerance in a Murine Model of Shrimp Allergy*. Int Arch Allergy Immunol, 2017. **174**(2): p. 86-96.
285. Freidl, R., et al., *Blocking antibodies induced by immunization with a hypoallergenic parvalbumin mutant reduce allergic symptoms in a mouse model of fish allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2017. **139**(6): p. 1897-1905 e1.
286. Fernandez Rivas, M., *Food allergy in Alergologica-2005*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2009. **19** Suppl 2: p. 37-44.
287. Muraro, A., et al., *EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy*. Allergy, 2014. **69**(8): p. 1008-25.

288. Le, T.M., et al., *Food avoidance in children with adverse food reactions: influence of anxiety and clinical parameters*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2013. **24**(7): p. 650-5.
289. Sindher, S., D.M. Fleischer, and J.M. Spergel, *Advances in the Treatment of Food Allergy: Sublingual and Epicutaneous Immunotherapy*. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2016. **36**(1): p. 39-54.
290. Uasuf, C.G., et al., *Different co-sensitizations could determine different risk assessment in peach allergy? Evaluation of an anaphylactic biomarker in Pru p 3 positive patients*. *Clin Mol Allergy*, 2015. **13**: p. 30.
291. Trompette, A., et al., *Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein*. *Nature*, 2009. **457**(7229): p. 585-8.
292. Eisenbarth, S.C., et al., *Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen*. *J Exp Med*, 2002. **196**(12): p. 1645-51.
293. Zhang, Y., X. Zhou, and B. Zhou, *DC-derived TSLP promotes Th2 polarization in LPS-primed allergic airway inflammation*. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(7): p. 1735-43.
294. Berin, M.C., et al., *Role of TLR4 in allergic sensitization to food proteins in mice*. *Allergy*, 2006. **61**(1): p. 64-71.
295. Tan, A.M., et al., *TLR4 signaling in stromal cells is critical for the initiation of allergic Th2 responses to inhaled antigen*. *J Immunol*, 2010. **184**(7): p. 3535-44.
296. Gerhold, K., et al., *Lipopolysaccharides modulate allergen-specific immune regulation in a murine model of mucosal tolerance induction*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2008. **147**(1): p. 25-34.
297. Wainstein, B.K., et al., *Prediction of anaphylaxis during peanut food challenge: usefulness of the peanut skin prick test (SPT) and specific IgE level*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2010. **21**(4 Pt 1): p. 603-11.
298. Ciprandi, G., et al., *Birch allergy and oral allergy syndrome: The practical relevance of serum immunoglobulin E to Bet v 1*. *Allergy Asthma Proc*, 2016. **37**(1): p. 43-9.
299. Jonsson, F., et al., *Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(4): p. 1484-96.
300. Strachan, D.P., *Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis"*. *Thorax*, 2000. **55 Suppl 1**: p. S2-10.
301. Dearman, R.J. and I. Kimber, *Animal models of protein allergenicity: potential benefits, pitfalls and challenges*. *Clin Exp Allergy*, 2009. **39**(4): p. 458-68.
302. Chehade, M. and L. Mayer, *Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities*. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. **115**(1): p. 3-12; quiz 13.
303. Sanchez-Lopez, J., et al., *Role of Art v 3 in pollinosis of patients allergic to Pru p 3*. *J Allergy Clin Immunol*, 2014. **133**(4): p. 1018-25.
304. Forbes, E., et al., *T helper-2 immunity regulates bronchial hyperresponsiveness in eosinophil-associated gastrointestinal disease in mice*. *Gastroenterology*, 2004. **127**(1): p. 105-18.
305. Fischer, R., et al., *Oral and nasal sensitization promote distinct immune responses and lung reactivity in a mouse model of peanut allergy*. *Am J Pathol*, 2005. **167**(6): p. 1621-30.
306. Dabbagh, K., et al., *Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells*. *J Immunol*, 2002. **168**(9): p. 4524-30.
307. Patel, D., et al., *Fel d 1-derived peptide antigen desensitization shows a persistent treatment effect 1 year after the start of dosing: a randomized, placebo-controlled study*. *J Allergy Clin Immunol*, 2013. **131**(1): p. 103-9 e1-7.
308. Berings, M., et al., *Advances and highlights in allergen immunotherapy: On the way to sustained clinical and immunologic tolerance*. *J Allergy Clin Immunol*, 2017. **140**(5): p. 1250-1267.
309. Kulis, M., et al., *Type B CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 responses to peanut antigens: modulation of sensitization and utility in a truncated immunotherapy regimen in mice*. *Mol Nutr Food Res*, 2013. **57**(5): p. 906-15.

310. Adel-Patient, K., et al., *Oral sensitization to peanut is highly enhanced by application of peanut extracts to intact skin, but is prevented when CpG and cholera toxin are added*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2007. **143**(1): p. 10-20.
311. James, L.K. and S.R. Durham, *Update on mechanisms of allergen injection immunotherapy*. *Clin Exp Allergy*, 2008. **38**(7): p. 1074-88.
312. Fernandez, T.D., et al., *Intracellular accumulation and immunological properties of fluorescent gold nanoclusters in human dendritic cells*. *Biomaterials*, 2015. **43**: p. 1-12.
313. Inoue, K., et al., *Effects of multi-walled carbon nanotubes on a murine allergic airway inflammation model*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009. **237**(3): p. 306-16.
314. Paar, J.M., et al., *Bivalent ligands with rigid double-stranded DNA spacers reveal structural constraints on signaling by Fc epsilon RI*. *J Immunol*, 2002. **169**(2): p. 856-64.
315. Kawakita, A., et al., *Immunotherapy with oligomannose-coated liposomes ameliorates allergic symptoms in a murine food allergy model*. *Allergy*, 2012. **67**(3): p. 371-9.
316. Berin, M.C. and L. Mayer, *Can we produce true tolerance in patients with food allergy?* *J Allergy Clin Immunol*, 2013. **131**(1): p. 14-22.
317. Wilbers, R.H., et al., *Production and glyco-engineering of immunomodulatory helminth glycoproteins in plants*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 45910.
318. Kapsenberg, M.L., *Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(12): p. 984-93.
319. Tanaka, Y., et al., *Oral CD103(-)CD11b(+) classical dendritic cells present sublingual antigen and induce Foxp3(+) regulatory T cells in draining lymph nodes*. *Mucosal Immunol*, 2017. **10**(1): p. 79-90.
320. Coombes, J.L., et al., *A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism*. *J Exp Med*, 2007. **204**(8): p. 1757-64.
321. Vickery, B.P., et al., *Sustained unresponsiveness to peanut in subjects who have completed peanut oral immunotherapy*. *J Allergy Clin Immunol*, 2014. **133**(2): p. 468-75.
322. Pocobelli, D., et al., *Nasal immunotherapy at constant dosage: a double-blind, placebo-controlled study in grass-allergic rhinoconjunctivitis*. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2001. **11**(2): p. 79-88.
323. Marcucci, F., et al., *Low-dose local nasal immunotherapy in children with perennial allergic rhinitis due to *Dermatophagoides**. *Allergy*, 2002. **57**(1): p. 23-8.
324. Lu, L.F., et al., *Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance*. *Nature*, 2006. **442**(7106): p. 997-1002.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ARTÍCULOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ARTÍCULO 1

***LPS promotes Th2 dependent sensitisation leading
to anaphylaxis in a Pru p 3 mouse model***

Rodríguez MJ, Aranda A, Fernández TD, Cubells-Baeza N, Torres MJ, Gómez F, Palomares F, Perkins JR, Rojo J, Díaz-Perales A, Mayorga C. LPS promotes Th2 dependent sensitization leading to anaphylaxis in a Pru p 3 mouse model. *Scientific Reports*, 2017 Jan 13, 7:40449. DOI: 10.1038/srep40449.

Pru p 3 is the major peach allergen in the Mediterranean area. It frequently elicits severe reactions, limiting its study in humans, raising the need for animal models to investigate the immunological mechanisms involved. However, no anaphylaxis model exists for Pru p 3. We aimed to develop a model of peach anaphylaxis by sensitising mice with Pru p 3 in combination with lipopolysaccharide (LPS) as an adjuvant. Four groups of mice were sensitised intranasally: untreated; treated with Pru p 3; treated with LPS; treated with Pru p 3 + LPS. After sensitisation mice were intraperitoneally challenged with Pru p 3 and *in vivo* and *in vitro* parameters were evaluated. Only mice in the Pru p 3 + LPS group showed anaphylaxis symptoms, including a decrease in temperature. Determination of *in vitro* parameters showed a Th2 response with an increase of Pru p 3-specific IgE and IgG1. Moreover, at the cellular level, we found increased levels of IgE and IgG1 secreting Pru p 3-specific cells and a proliferative CD4⁺ T-cell response. These results demonstrate that Pru p 3-specific anaphylaxis can be generated after nasal sensitisation to Pru p 3 in combination with LPS. This is a promising model for evaluating food allergy immunotherapies.

ARTÍCULO 2

Pru p 3-Epitope-based sublingual Immunotherapy in a murine model for the treatment of peach allergy

Rodríguez MJ, Mascaraque A, Ramos-Soriano FJ, Torres MJ, Perkins JR, Gómez F, Garrido M, Cubells N, Andreu D, Díaz-Perales A, Rojo J, Mayorga C. Pru p 3-Epitope-based sublingual immunotherapy in a murine model for the treatment of peach allergy. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2017 Jun 6. 61 (10). DOI: 10.1002/mnfr.201700110.

Scope: Food-specific immunotherapy (SIT) is a promising treatment for lipid transfer protein (LTP)-syndrome. We propose a novel sublingual-SIT (SLIT) that combines a Pru p 3 T-cell peptide and an oligodeoxyribonucleotide (ODN) with CpG motifs (ODN-CpG) as adjuvants to induce a specific Th1/Treg response.

Methods and results: LTP-peach allergic mice were treated sublingually with a combination of a CpG sequence and mono- or tetravalent systems including a Pru p 3 peptide, D₁(Prup3) or D₄(Prup3). Mice were challenged intraperitoneally with Pru p 3 one or three weeks after SLIT and tolerance was assessed.

Mice treated with D₁(Prup3)+CpG were protected from anaphylaxis after Pru p 3 challenge. They showed no change in body temperature, lower levels of Pru p 3-specific IgE and IgG1 antibodies and higher levels of sIgG2a compared to the untreated group. They had fewer IgE and IgG1 secreting cells and more sIgG2a secreting cells. Moreover, a significantly lower number of Pru p 3-specific CD4⁺T cells and a higher number of Treg cells were found, alongside a Th1 cytokine pattern. These changes were maintained for three weeks after stopping treatment.

Conclusion: D₁Prup3+CpG represents a promising SIT for food allergy. It is easily synthesized and induces protection from anaphylaxis to Pru p 3 that is maintained for at least three weeks.

ARTÍCULO 3

Glycosylated nanostructures in sublingual immunotherapy induce long-lasting tolerance in LTP allergy mouse model

Rodríguez MJ, Ramos-Soriano J, Perkins JR, Mascaraque A, Torres MJ, Gómez F, Díaz-Perales A, Rojo J, Mayorga C. Glycosylated nanostructures in sublingual immunotherapy induce longlasting tolerance in LTP allergy mouse model. *Scientific Reports*, 2019 Mar 11, 9:4043. DOI: 10.1038/s41598-019-40114-7.

An effective specific immunotherapy should contain elements to generate specific recognition (T-cell peptides) and to modulate the immunological response towards a Th1/Treg pattern by enhancing dendritic cells (DCs). We propose a novel sublingual immunotherapy for peach allergy, using systems, that combine Prup3-T-cell peptides with mannose dendrons (D₁ManPrup3 and D₄ManPrup3). Peach anaphylactic mice were treated 1, 2 and 5 nM concentrations. Tolerance was assessed one/five weeks after finishing treatment by determining in vivo/in vitro parameters after challenge with Pru p 3. Only mice receiving D₁ManPrup3 at 2 nM were protected from anaphylaxis (no temperature changes, decrease in Pru p 3-sIgE and -sIgG1 antibody levels, and secreting cells) compared to PBS-treated mice. Moreover, an increase of Treg-cells and regulatory cytokines (IL-10+/IFN- γ +) in CD4⁺-T-cells and DCs were found. These changes were maintained at least five weeks after stopping treatment. D₁ManPrup3 is an effective new approach of immunotherapy inducing protection from anaphylaxis which persists after finishing treatment.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA