

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



TESIS DOCTORAL

**Identificación de biomarcadores y estudio de las bases
moleculares en anafilaxia: proteínas circulantes, vesículas
extracelulares y microARNs**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Emilio Núñez Borque

Directora

Vanesa Esteban Vázquez

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

Identificación de biomarcadores y estudio de las bases moleculares en anafilaxia: proteínas
circulantes, vesículas extracelulares y microARNs

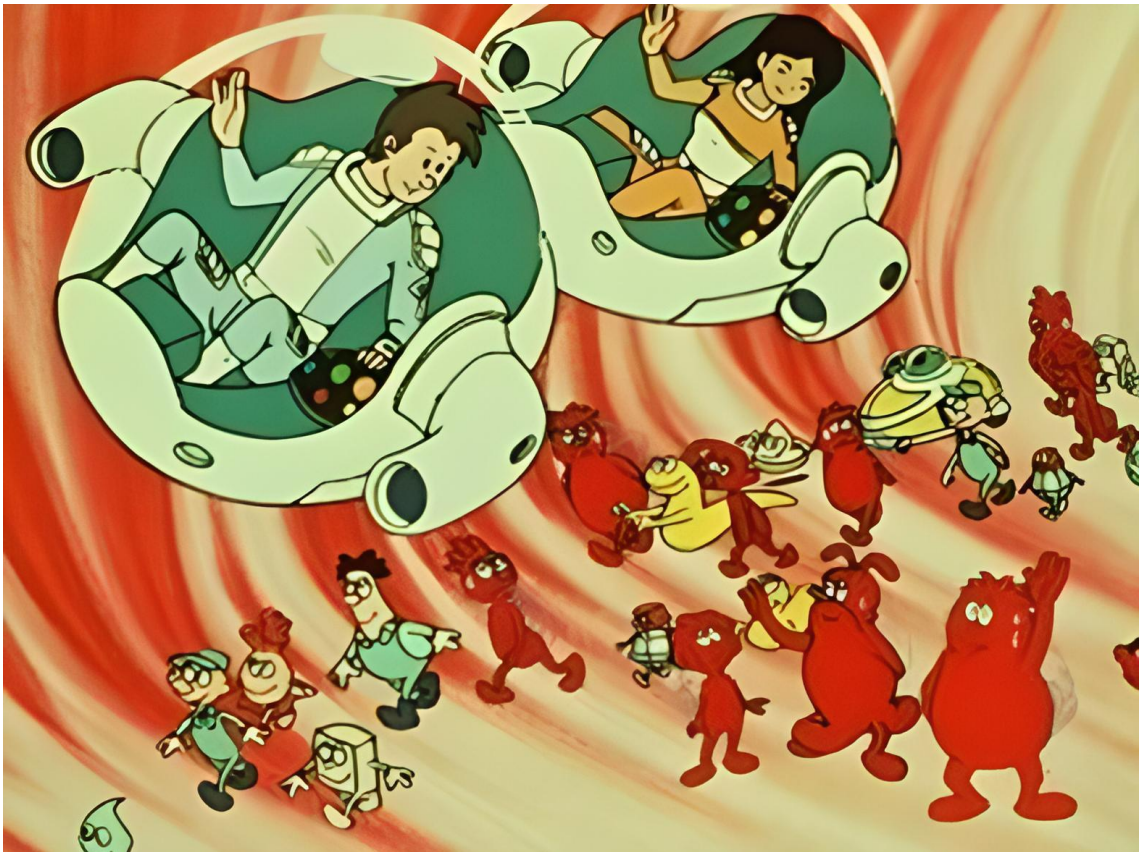
MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Emilio Núñez Borque

DIRECTORA

Dra. Vanesa Esteban Vázquez



“Y así empezó todo...”

*A mi familia,
Principio y fin de este camino.*



I. AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos.

AGRADECIMIENTOS

Tranquilidad, no os asustéis, que sí que hay agradecimientos. Prometo que redacto estas líneas por voluntad propia y que no me encuentro coaccionado por mi jefa o por mi madre... sobre todo por mi madre.

Ahora en serio. Hay tantas personas a las que me gustaría dar las gracias que no se ni siquiera por dónde empezar. Los que me conocéis sabéis que esto no es mi fuerte y mentiría si dijera que me resulta fácil escribir estas palabras. Sin embargo, eso no significa que no las sienta. Como dijo una buena amiga, “es que no te gustan las cosas bonitas” (voz muy aguda), pero las rosas no son rosas sin espinas.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi fantástica directora de tesis, **Van**. Gracias por guiarme durante todos estos años. Siempre has valorado mis ideas y me has dado una independencia que me ha permitido desarrollarme como científico y como persona (prefiero no decir madurar porque luego me llamas viejo). Normal que todo el mundo tenga envidia cuando hablamos de jefes. Ojalá pueda ser la mitad de bueno que tú en el futuro. Todo lo que consiga a partir de ahora siempre va a ser también mérito tuyo. Puede que esta etapa termine, pero siempre vas a tener un amigo y, esperemos, un colaborador para lo que necesites. Muchísimas gracias por todo.

Por otra parte, quiero dar las gracias a la comunidad de Madrid y al proyecto FOOD-AL que me han respaldado durante los últimos 4 años permitiéndome desarrollar esta tesis doctoral. Además, me gustaría agradecer a otras entidades como al Instituto de Salud Carlos III, la fundación Alfonso X el sabio y la Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica (SEAIC) por financiar los experimentos incluidos en esta tesis. Asimismo, tengo que dar las gracias a todo el personal de medicina y enfermería de los diferentes hospitales que nos han facilitado las muestras utilizadas, así como a todos los pacientes que han dedicado su tiempo y voluntad a participar en estos estudios.

En segundo lugar, me gustaría dar las gracias a la otra jefa del laboratorio, **Gloría**. De verdad Gloria, no insistas, eres nuestra segunda jefa, aunque no sea oficial, te guste o no. Aún me acuerdo de ese sábado por la mañana en un partido de Martín cuando te estaba contando que me iba a Florida y de repente llegó ese mensaje que lo cambió todo. 4 años han pasado... quién lo diría. Gracias por tu ayuda todo este tiempo, desde esas charlas en el despacho sobre la vida, hasta esas excursiones a por chocolate picándonos por como meter los términos “medicina de precisión”, “traslacional” y “diagnóstico personalizado” en el mismo título. Lo voy a echar de menos. ¿Quién se va a meter conmigo ahora?

Por supuesto, no puedo olvidarme de todos mis compañeros y compañeras del maravilloso laboratorio de inmuoalergia y proteómica. **Carlos**, muchas gracias por todo lo que me has enseñado a lo largo de estos años. Es un placer verte tan contento de profesor en la universidad, te lo mereces. Eso sí, creo que podría repetir tu charla a las residentes de memoria, aunque sigo sin entender el efecto Kohlrausch. No obstante, si hablamos de merecer, aquí hay un nombre propio. Muchas gracias, **Marta**, Marta IP, te lo dije desde que llegaste. Creo que no me he alegrado tanto de ninguna noticia mía como ese día. Conseguiste tenernos a todos refrescando la página del Carlos III cada medio minuto y eso demuestra el cariño que generas. ¡Encima tienes tele! He usado “BuscarV” para buscar mejores jefas para el laboratorio que tú, pero no las he encontrado y, si así no sale, es porque no existen. Gracias por ayudarnos siempre con todo lo que hemos necesitado, eres un ejemplo. **Sergio**, muchas gracias por tu compañía y

ayuda estos años, “bro”. Posiblemente seas la persona que más me ha sacado de quicio en toda mi vida, sin ninguna duda, pero te echaré de menos amigo. Estoy tranquilo sabiendo que el laboratorio se queda en buenas manos y que vas a encargarte de sacar todo adelante. No se me ocurre nadie mejor para ello. Enhorabuena, eres oficialmente el nuevo “boss”. **Aránzazu**, que grande eres, obviamente lo digo en sentido figurado. Creo que no se puede ser una persona más feliz y alegre que tú. Es un placer trabajar contigo, Zazú. Consigues contagiarle una sonrisa a cualquiera, incluso a mí. Eso sí, los que te conocemos sabemos que puedes convertirte en el terror de los sofás o de cualquier feriante sin escrúpulos que venda pollitos de colores. **Paula**, gracias por tu ayuda, por tu compañía y por las risas que nos hemos echado durante todos los años que compartimos juntos en el laboratorio. Siempre has ejercido de madre con nosotros y nos has cuidado en todo momento, incluso dejando de lado tus propios problemas por ayudarnos. Tranquila, que me he lavado las manos, “tú te cré”. Oye... ¿Cómo se llamaba la otra? ¿**Ari**? ¡Eso! Muchas gracias “peloti”, quien nos iba a decir que íbamos a acabar siendo colegas al final ¡incluso publicando artículos juntos! Según escribía los agradecimientos solo podía pensar que con lo “chapas” que eres vas a rellenar 10 hojas en tu tesis. Una tesis que estoy seguro de que vas a bordar porque eres una crack. Poca gente se esfuerza tanto y tiene tanta cabeza como tú ¡Qué suerte tienen Marta y Gloria! Eso sí, no pienso dejar por escrito que me caes bien porque luego no podría negarlo. **Nuria**, parece ayer cuando empezamos los dos en el laboratorio, todo lo que hemos pasado, desde risas hasta radiadores. Al final has sido la más lista de todos. Lo que tengo claro es que te va a ir genial en todo lo que hagas porque nunca te he visto bajar los brazos ni dejar de esforzarte pasara lo que pasara. ¡Vaya fichaje han hecho en la farma! **Lucía**, aunque has sido de las últimas en llegar, entraste tirando la puerta abajo. Muchas gracias por todos estos meses. Te dejo como ánGel de la guarda de Sergio. Formáis un equipazo, mantenedlo porque os va a ir genial, lo tengo claro, así que no os flageéis. Además, quiero agradecer a todos los demás compañeros que han pasado por el laboratorio y con los que tantos momentos he compartido, gracias, **Martita, Javi, Alonso, Beni, Miriam, Isra, Álvaro, Elena, Alma...** A su vez, también me gustaría dar las gracias a las dos espectaculares auxiliares de investigación, **Julia y Amelia**. Gracias por llevar a cabo todos los días ese trabajo invisible del que no somos conscientes y que tanto nos soluciona. Sin vosotras la planta colapsaría, muchísimas gracias.

De igual manera, también tengo que dar las gracias al servicio de alergología de la Fundación Jiménez Díaz. En primer lugar, a **Javier**, por toda su ayuda estos años enseñándome tanto de la alergia y cuidándome como a uno más del servicio. Ojalá todo el mundo valorara tanto la investigación como lo haces tú, gracias. En segundo lugar, a **Diana**. Muchas gracias “compi”. Gracias por todo lo que nos has ayudado de forma completamente desinteresada, desde que teníamos cualquier urgencia médica hasta cuando necesitábamos completar una base de datos de muestras. Siempre recordaré las tardes que nos pasábamos haciendo geles, riéndonos y hablando de la vida. No tengo dudas de que vas a ser una fantástica jefa de servicio, aunque me digas “quita quita...”. Eso sí, si me preguntaran en que he fracasado durante esta tesis tendría la respuesta clara, en que te pongas guantes. Por otra parte, me gustaría también dar las gracias al resto de médicos con los que he compartido estos años, de los que tanto he aprendido y con los que tan buenos ratos he pasado, sobre todo en los congresos. Muchas gracias, **Victoria, Alicia, Raquel, Manolo, Manu, Laura, Leyre, Blanca, Marcela, Bea, Carlos, Nacho, Jaime, María...** sois geniales. La especialidad está en buenas manos.

AGRADECIMIENTOS

Desde luego, no pueden faltar los agradecimientos a la Dra. Victoria del Pozo, **Vito**, y a los miembros de su laboratorio. **José, Bea, Toño**, creo que nunca voy a poder agradeceros todo lo que me habéis ayudado desde que llegué a la Fundación. Siempre me recibíais con los brazos abiertos para resolverme cualquier duda que tuviera. De hecho, seguís haciéndolo. Cada vez que me preguntan algo y no lo sé, siempre respondo lo mismo “ni idea, pero espera que pregunte en el labo de Vito, que seguro que lo saben”. Mil gracias por todo.

¿Qué es lo mejor que me llevo de la tesis? Si me preguntaran supongo que tendría que decir que los conocimientos, los artículos o la experiencia científica de estos años. Sin embargo, tengo la respuesta clara. La FJuanpaD, por supuesto. **Isma, Antonio, Juanpa**, que grandes sois amigos. ¡Qué suerte haber coincidido con vosotros! No se puede ser mejores personas y científicos, de verdad. Era imposible pasármelo mejor. Lo que hemos madurado juntos. Esas conversaciones que cambiaban en cuestión de segundos de discutir de ciencia, a debatir de las diferencias entre un oxímoron y una alegoría, y acababan reconstruyendo la noche anterior con un “por favor, no me lo recuerdes”. Los amigos que merezco.

Óscar, Mario, Bea. Bendito máster de inmunología. Podría añadirlos al párrafo anterior perfectamente, por lo que hago extensibles todas esas palabras. Siempre habéis estado ahí cuando lo he necesitado y sois un ejemplo de personas y científicos. ¡Qué ganas tengo de veros triunfar y poder fardar de amigos! Muchas gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos, y los que nos quedan.

Por supuesto no puedo olvidarme del resto de personas de otros laboratorios con las que he compartido estos años. Ha sido un honor coincidir con una generación como vosotros. Esos viernes saliendo del hospital para ahogar las penas o celebrar los triunfos de los compañeros eran lo mejor de la semana. Perdonadme que no os nombre y os agradezca a todos por individual, pero necesitaría al menos 3 tesis para ello. Sin embargo, sí que me gustaría hacer una excepción con el mejor investigador de la historia de Chile. **Lucas**, obvio. Muchas gracias, cachay. Si tenemos el grupo que tenemos, es gracias a ti. No hemos podido tener un mejor ejemplo de vida, de persona y de científico que tú. Seguramente porque es imposible. Dentro de un mundo que constantemente nos empuja a competir llegabas tú para recordarnos la magia y la pasión de investigar, lo importante que era ayudarnos y colaborar, y nos contagiabas tu ilusión ¡Qué grande eres y como te echamos de menos en España!

D'altra parte, vorrei ringraziare alla dottoressa **Angela di Giannatale** per avermi accolto 3 mesi nel suo laboratorio presso l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù. È stato un vero piacere condividere questa esperienza con persone così meravigliose come voi. Ho imparato moltissimo e mi sono innamorato di una città spettacolare come è Roma. Vi ringrazierò sempre per avermi accompagnato nel mio “giro de Peppe intorno alla Reale”. A Madrid sarete per sempre benvenuti.

A su vez me gustaría dar las gracias a **Ángeles** quien me abrió las puertas de su laboratorio para realizar mi TFG y me guio en mis primeros pasos en investigación. Asimismo, no me puedo olvidar de mis dos queridos compañeros durante esa aventura, **Alex y Diana**. Creo que es imposible generar más anécdotas en tan poco tiempo. Gracias por hacerme disfrutar cada día que pasé en el CIB, vaya equipazo éramos. Como me alegra ver todo lo que habéis triunfado, os lo merecéis. Pero sigo sin tener clara una cosa ¿Dónde va el Epi, dentro o fuera?

Alfonso, Rubén, Paula, Javi. Este camino lo empezamos juntos y lo continuamos igual. Da igual la distancia y el tiempo, los amigos de verdad siempre se mantienen. Gracias por seguir acompañándome desde primero de carrera. Nunca voy a dejar de aprender de vosotros, eso lo tengo claro.

Si hablamos de caminos juntos, que os voy a contar **Javi, Martín.** Una vida podría decirse. Creo que no recuerdo ninguna etapa en la que no hayáis estado ahí y lo más importante, no se me ocurre ninguna en la que no quiera que estéis. Gracias por estos más de 20 años juntos, que mayores nos hemos hecho. 2-5-8 hermanos, os quiero. Por supuesto, no puedo olvidarme del resto del Piccola. Sois el grupo de amigos que toda persona tiene miedo de presentar y, a la vez, con el que mejor sabes que te lo vas a pasar. ¡Díselo! **Pino, Cende, Santi, Talenti, Victor.** ¿Alguien ha dicho limoncello?

Nacho, que te voy a decir. Si es que siempre has estado ahí, desde que nací. En mi memoria no existe un solo recuerdo o momento en el que no hayamos sido amigos. Desde que pasábamos las tardes jugando al Pro hasta que veraneábamos juntos. Al final siempre he tenido un hermano mayor. ¿Y qué agradecerte después de tantos años? Pues todo, la verdad. Porque sabía que siempre que me hiciera falta ibas a estar ahí. No obstante, sí que hay una cosa que me gustaría destacar y es darte las gracias porque me llevaras a tu pueblo. A la villa de infanzones, a **Veganzones.** Ese pueblo donde incluso he sido quinto y donde he hecho tantísimos amigos. Un lugar que siempre me ha acogido con los brazos abiertos aun siendo “extranjero” y que voy a llevar conmigo vaya donde vaya. Mi corazón siempre va a ser de Veganzones, de Segovia y de su gente, eso no va a cambiar. ¡Si hasta aprendí a bailar la jota! O eso creo.

Por supuesto, tengo que agradecer al **Manila Estrellas,** mi equipo, mi casa. Empecé siendo todavía un adolescente, pero los valores que me habéis enseñado a través del deporte nunca se me van a olvidar. El altruismo, el compañerismo y la solidaridad que me habéis transmitido me van a acompañar siempre. Entre todas las personas que forman parte de este gran club, me encantaría dar las gracias a mi querido Regional “B” con los que he compartido tantas derrotas y victorias y a dos entrenadores en particular, **Victoria y Juan.** La forma que tenéis de cuidar a vuestra gente y darlo todo por ellos es espectacular. Sois un ejemplo como deportistas y como personas. Los que nos hemos convertido en entrenadores es gracias a vosotros. Nunca estaremos a vuestra altura, pero prometemos darlo todo por intentarlo. A su vez, tengo que dar las gracias a mi compañero y amigo, **Carlos,** chirlas. Si Vicky y Juan son un ejemplo, tú eres otro. Como amigo, como jugador, como entrenador y como persona. Gracias por alegrarme todos los días durante tantos años. Da igual lo que pase que sé que siempre estás ahí para ayudarme o para hacerme reír con ese humor que solo tú tienes, eres un grande. ¿Y sabes lo mejor? Todos los años que aún nos quedan ¡La dupla, niño! Por otra parte, también me gustaría agradecer a mi “chavales”. Sin olvidarme de esos padres y madres modelo que tenéis y que dan todo por vosotros, sois muy afortunados. Parece ayer cuando empecé a entrenaros en alevín. Como habéis crecido. Lo que no sabéis es todo lo que me habéis ayudado a madurar a mí por el camino. Ni todas las veces que salía del laboratorio con ganas de dejarlo todo y conseguíais sacarme una sonrisa. O la de veces que me desesperabais tanto que hacíais que se me olvidara. Chicos, sois un equipazo y espero que lo mantengáis siempre, como he hecho yo con mis compañeros. Porque ganar está bien, pero ganar con amigos es incomparable. No sé cuánto tiempo más seré vuestro entrenador, pero lo que sí que se es que siempre tendréis un amigo para cuando os haga falta. ¡Siempre verdes, siempre Manila!

AGRADECIMIENTOS

De igual manera, quiero dar las gracias a mi familia quien siempre me ha apoyado, todo esto es por vosotros. En primer lugar, a mi **padre**, mi **madre** y mi **hermana**, que constantemente han estado ahí cuando los he necesitado y que me han animado a dedicarme a lo que me gustaba. Me habéis enseñado que si quiero algo tengo que esforzarme. Nunca habría llegado a conseguir nada de esto sin vuestra ayuda. Gracias. Por otra parte, también quiero dar las gracias a mi tía **Maisus** y a mi tío **Ricardo**, quienes desde pequeño me explicaron las maravillas de la biología, de la medicina, de la ciencia y de la investigación. La motivación que siento hacía esta profesión es en gran parte por vosotros, gracias.

Por último, muchísimas gracias, **Jimena**. Sin lugar a duda, eres quien más me ha aguantado durante esta tesis y a quien más tengo que agradecer. Pero no solo por esto, si no por todo lo que haces por mí, eres la mejor. Podría escribir 10, 100 o 1000 páginas dándote las gracias y seguiría quedándome corto. Cada día que estamos juntos consigues que sea mejor persona. Eres un ejemplo a seguir, porque no se puede ser mejor persona, ni más buena. No sabes la ilusión que me hace poder compartir este momento contigo. Ni la alegría que siento al ver el camino que hemos recorrido juntos y lo que nos queda todavía por recorrer. Eres mi suerte. Muchísimas gracias. Te quiero.

- ¿Y no te da pena acabar?
- Sí, la verdad. Mucha.
- ¿Entonces, por qué sonríes?
- No lo sé... supongo que será que todo ha terminado bien.



II. ÍNDICE

I. AGRADECIMIENTOS	1
II. ÍNDICE	9
III. RESUMEN	15
IV. SUMMARY	18
V. ABREVIATURAS	21
1. INTRODUCCIÓN	26
1.1. Anafilaxia	28
1.1.1. Epidemiología	29
1.1.2. Bases moleculares de la reacción	29
1.1.2.1. Mecanismos celulares y moleculares mediados por IgE	29
1.1.2.2. Mecanismos celulares y moleculares independientes de IgE	30
1.1.3. Diagnóstico	31
1.1.4. Tratamiento	32
1.2. Sistema cardiovascular	33
1.2.1. Célula endotelial	34
1.2.2. Fisiopatología cardiovascular en anafilaxia	34
1.2.3. Permeabilidad vascular en anafilaxia	35
1.3. Vesículas extracelulares	36
1.3.1. Biogénesis de las vesículas extracelulares	37
1.3.2. Mecanismos de acción y funciones de las vesículas extracelulares	37
1.3.3. Vesículas extracelulares como biomarcadores	39
1.4. MicroARNs	39
1.4.1. Biogénesis de los microARNs	39
1.4.2. Mecanismo de acción y funciones de los microARNs	40
1.4.3. MicroARNs como biomarcadores	41
2. HIPÓTESIS	42
3. OBJETIVOS	45
4. MATERIALES Y MÉTODOS	48
4.1. Pacientes	50
4.1.1. Pacientes incluidos en el estudio	50
4.1.2. Comité ético	50
4.1.3. Obtención de las muestras	51
4.2. Determinación de proteínas séricas	51
4.2.1. Medidas de triptasa sérica	51
4.2.3. Evaluación del perfil de proteínas séricas	52
4.2.4. Determinación de los valores de albúmina sérica humana	52
4.2.5. Evaluación de los niveles de la subunidad β de la hemoglobina	53
4.2.6. Identificación mediante espectrometría de masas de proteínas extraídas de gel	53
4.3. Vesículas extracelulares	54
4.3.1. Purificación de vesículas extracelulares	54
4.3.1.1. Purificación de vesículas extracelulares a partir de plasma	54
4.3.1.2. Purificación de vesículas extracelulares a partir de suero	54
4.3.2. Microscopía electrónica	54
4.3.3. Análisis del trazado de nanopartículas	55
4.3.4. Determinación del perfil proteico de las vesículas extracelulares	55
4.3.4.1. Digestión de las proteínas y pre-fraccionamiento de los péptidos	55
4.3.4.2. Cromatografía líquida y análisis por espectrómetro de masas	55
4.3.4.3. Cuantificación de proteínas y análisis de datos	56
4.3.5. Determinación de los niveles de proteínas en las vesículas extracelulares	56

4.4. MicroARNs	57
4.4.1. Determinación del perfil de microARNs séricos circulantes	57
4.4.1.1. Preparación de las librerías	57
4.4.1.2. Análisis de los datos y mapeo de las lecturas	57
4.4.2. Extracción de ARN	58
4.4.2.1. Extracción del ARN sérico	58
4.4.2.2. Extracción del ARN de las vesículas extracelulares	59
4.4.2.3. Extracción del ARN intracelular	59
4.4.3. Transcripción inversa	59
4.4.4. Cuantificación de los niveles de microARNs	59
4.5. Análisis de biología de sistemas	60
4.6. Cultivos celulares	61
4.6.1. Células endoteliales	61
4.6.2. Células mononucleares de sangre periférica	61
4.7. Ensayos funcionales	62
4.7.1. Ensayos funcionales de las vesículas extracelulares	62
4.7.1.1. Tinción de las vesículas extracelulares con PKH67	62
4.7.1.2. Estudio de la interacción entre las células endoteliales y las vesículas extracelulares	62
4.7.1.3. Ensayo de permeabilidad endotelial en respuesta a las vesículas extracelulares	63
4.7.1.4. Captación de las vesículas extracelulares por las células mononucleares de sangre periférica	64
4.7.2. Ensayos funcionales de microARNs en células endoteliales	65
4.7.2.1. Evaluación de los niveles de miR-21-3p y miR-487b-3p en respuesta a estímulos de anafilaxia	65
4.7.2.2. Transfección del miR-375-3p en células endoteliales	66
4.7.2.3. Ensayo de permeabilidad endotelial en células transfectadas con el miR-375-3p	67
4.8. Análisis estadísticos	67
4.8.1. Análisis de las proteínas séricas circulantes	68
4.8.2. Análisis de las vesículas extracelulares	68
4.8.3. Análisis de los microARNs	69
5. RESULTADOS	70
5.1. Proteínas séricas circulantes en anafilaxia: diagnóstico personalizado y cuantificación indirecta de la extravasación en humanos	72
5.1.1. Características de los pacientes y de sus reacciones de hipersensibilidad	72
5.1.2. La relación entre los niveles agudos y basales de triptasa sérica presenta una mejor capacidad diagnóstica de la anafilaxia	73
5.1.3. La concentración de proteínas séricas disminuye durante la anafilaxia	74
5.1.4. Los niveles de albúmina sérica humana descienden durante la anafilaxia	75
5.1.5. La subunidad β de la hemoglobina aumenta en la fase aguda de los pacientes con reacciones de hipersensibilidad	76
5.2. Caracterización del perfil proteómico de las vesículas extracelulares de pacientes con anafilaxia y estudio de su papel en las bases moleculares de la reacción	78
5.2.1. Pacientes utilizados para el estudio de las vesículas extracelulares en anafilaxia	78
5.2.2. Caracterización de las vesículas extracelulares de los pacientes con anafilaxia	79
5.2.3. Perfil proteómico de las vesículas extracelulares de los pacientes con anafilaxia	79
5.2.4. Los niveles de las proteínas CDC42, S100A9 y Ficolina 2 aumentan durante la fase aguda en las vesículas extracelulares de los pacientes con anafilaxia	82
5.2.5. Análisis de biología de sistemas del panel de proteínas diferenciales identificado en las vesículas extracelulares de los pacientes con anafilaxia	83
5.2.6. Las vesículas extracelulares de plasma de pacientes con anafilaxia inducen un aumento de la permeabilidad vascular en células endoteliales humanas	84

5.2.7. Las células mononucleares de sangre periférica de donantes no atópicos captan las vesículas extracelulares de pacientes con anafilaxia	85
5.3. Análisis de los niveles de microARNs séricos circulantes en niños con anafilaxia inducida por alimentos	88
5.3.1. Población pediátrica utilizada para el estudio de los microARNs	88
5.3.2. Caracterización del perfil de microARNs séricos circulantes en niños con anafilaxia inducida por alimentos	88
5.3.3. Los niveles séricos del miR-21-3p y el miR-487b-3p aumentan durante la fase aguda de la reacción en niños con anafilaxia por alimentos	91
5.3.4. Análisis de biología de sistemas del miR-21-3p y del miR-487b-3p	92
5.3.5. El miR-21-3p aumenta tras la incubación de las células endoteliales en condiciones anafilácticas	93
5.3.6. Caracterización de las vesículas extracelulares purificadas a partir de suero de niños con anafilaxia por alimentos	95
5.3.7. Los niveles del miR-21-3p aumentan en las vesículas extracelulares de niños con anafilaxia por alimentos durante la fase aguda de la reacción	95
5.4. Estudio de los niveles del miR-375-3p en los pacientes con anafilaxia	97
5.4.1. Pacientes con anafilaxia incluidos en el estudio de los microARNs	97
5.4.2. Identificación del perfil de microARNs séricos circulantes en adultos con anafilaxia inducida por fármacos	98
5.4.3. Los niveles séricos del miR-375-3p disminuyen durante la fase aguda de la reacción en los pacientes con anafilaxia	99
5.4.4. Caracterización de las vesículas extracelulares purificadas a partir de suero de pacientes con anafilaxia	101
5.4.5. Los niveles del miR-375-3p disminuyen en las vesículas extracelulares purificadas a partir de suero de la fase aguda de la anafilaxia	102
5.4.6. Análisis de biología de sistemas del miR-375-3p	102
5.4.7. El miR-375-3p bloquea parcialmente el efecto estabilizador del AMPc en la barrera endotelial	103
6. DISCUSIÓN	106
6.1. Identificación de biomarcadores en anafilaxia	108
6.1.1. La medicina personalizada de los pacientes con anafilaxia mejora la capacidad diagnóstica de la triptasa sérica	109
6.1.2. Cuantificación indirecta de la extravasación subyacente a la anafilaxia en humanos	109
6.1.3. Nuevos biomarcadores en anafilaxia: vesículas extracelulares y microARNs	111
6.2. Estudio de las bases moleculares de la anafilaxia	114
6.2.1. Procesos biológicos relacionados con las proteínas de las vesículas extracelulares y asociados a la anafilaxia	115
6.2.2. Procesos biológicos asociados al miR-21-3p, miR-487b-3p y miR-375-3p en anafilaxia	117
6.2.3. Efecto del miR-21-3p, miR-487b-3p y miR-375-3p en la fisiopatología cardiovascular de la anafilaxia	121
6.2.4. Función de las vesículas extracelulares y los microARNs en las células endoteliales de la microvasculatura	122
7. LIMITACIONES	124
7.1. Heterogeneidad de los pacientes y las reacciones	126
7.2. Calidad y cantidad de las muestras de sangre periférica	127
7.3. Problemas asociados a las determinaciones de proteínas séricas	127
7.4. Limitaciones de los estudios ómicos	128
7.5. Variaciones metodológicas de los estudios de las vesículas extracelulares	128

ÍNDICE

7.6. Problemas de los análisis de microARNs _____	129
7.7. Limitaciones de los análisis de biología de sistemas _____	129
7.8. Problemas de los ensayos <i>in vitro</i> de células endoteliales _____	129
8. CONCLUSIONES _____	131
9. CONCLUSIONS _____	134
10. BIBLIOGRAFÍA _____	137
11. ANEXOS _____	158
12. PUBLICACIONES _____	161
12.1. Publicaciones derivadas de esta tesis _____	163
12.2. Otras publicaciones realizadas durante el desarrollo de esta tesis _____	164



III. RESUMEN

La anafilaxia es la manifestación más grave de los trastornos alérgicos. En los últimos años la incidencia de este evento patológico ha ido en aumento. Sin embargo, estos datos se considera que están subestimados debido a la falta de biomarcadores eficaces que confirmen su diagnóstico. La reacción anafiláctica se produce principalmente por la activación de los mastocitos y los basófilos, los cuales liberan los mediadores que causan los síntomas de este evento patológico. Entre ellos, destacan las manifestaciones cardiovasculares ya que determinan el desarrollo de los casos más graves. A su vez, el endotelio resulta especialmente afectado y es el componente principal de los procesos relacionados con la permeabilidad vascular e hipotensión. No obstante, se han descrito otras células y vías de señalización implicadas en la reacción. Los microARNs (miARNs) y las vesículas extracelulares (VEs) regulan varios mecanismos moleculares y se han propuesto como biomarcadores de distintas enfermedades. Sin embargo, nunca habían sido estudiados durante la anafilaxia en humanos.

Los objetivos de esta tesis fueron identificar las proteínas, las VEs y los miARNs circulantes, evaluar su uso como biomarcadores y estudiar su papel en las bases moleculares de la anafilaxia. Para ello, se utilizaron muestras de sangre periférica de 154 pacientes obtenidas durante la reacción (fase aguda) y transcurridos al menos 14 días (fase basal).

En primer lugar, se determinó que considerar las medidas basales de la triptasa sérica mejoraba su uso como marcador diagnóstico. Por otra parte, se describió un descenso de la concentración de proteínas séricas y de los niveles de albúmina sérica humana acorde a la gravedad de la reacción. Estas medidas permitirían cuantificar indirectamente la extravasación subyacente a la anafilaxia y se proponen como potenciales biomarcadores. A su vez, se observó un aumento de la subunidad beta de la hemoglobina independientemente de la gravedad de la reacción.

Las VEs de plasma se purificaron mediante ultracentrifugación y se caracterizaron por microscopía electrónica, Western blot y análisis del trazado de nanopartículas. El estudio por espectrometría de masas determinó un panel diferencial de 99 proteínas entre las VEs de la fase aguda y la basal. Asimismo, los análisis de los miARNs séricos circulantes mediante secuenciación de nueva generación describieron cambios significativos entre ambas fases de 41 y 21 moléculas en los niños con reacciones por alimentos y en los adultos con anafilaxia por medicamentos, respectivamente. A partir de estos estudios a gran escala, se validaron las proteínas CDC42, S100A9 y Ficolina 2 de las VEs y los miARNs miR-21-3p, miR-487b-3p y miR-375-3p en una cohorte mayor de pacientes con anafilaxia, postulándose como posibles biomarcadores de la reacción. A su vez, se aislaron y caracterizaron las VEs de suero y se observaron cambios en sus niveles de miR-21-3p y miR-375-3p entre las fases aguda y la basal.

Los análisis de biología de sistemas del panel de 99 proteínas de las VEs y de los genes diana del miR-21-3p, miR-487b-3p y miR-375-3p identificaron que estas moléculas participaban en procesos propios de la anafilaxia, entre los que destacaba la respuesta inmune. Además, se asociaron con las alteraciones cardiovascular subyacentes a este evento patológico. Los estudios funcionales determinaron que los monocitos eran la población de células mononucleares de sangre periférica que captaba mayoritariamente las VEs de los pacientes. Además, estas partículas se internalizaron por las células endoteliales (CEs) y causaron una pérdida de la resistencia endotelial. Por otra parte, las CEs incubadas en condiciones de anafilaxia *in vitro* aumentaron los niveles intracelulares del miR-21-3p y contribuyeron a su liberación al medio extracelular. Además, el mimico del miR-375-3p bloqueó parcialmente la estabilización de la barrera endotelial mediada por el AMPc.



IV. SUMMARY

SUMMARY

Anaphylaxis is the most severe manifestation of allergic disorders. In recent years the incidence of this pathological event has been increased. However, these data are underestimated due to the lack of effective biomarkers to confirm its diagnosis. The anaphylactic reaction is mainly induced by the activation of mast cells and basophils, which release mediators that cause the symptoms of this pathological event. Among them, cardiovascular manifestations stand out as they determine the development of the most severe cases. In turn, the endothelium results particularly affected, and it is the main component involved in vascular permeability and hypotension processes. MicroRNAs (miRNAs) and extracellular vesicles (EVs) regulate various molecular mechanisms and have been proposed as biomarkers of several diseases. However, they have never been studied in human anaphylaxis.

The objectives of this thesis were to identify different circulating molecules (proteins, EVs and miRNAs), to evaluate their use as biomarkers and to study their role in the molecular basis of anaphylaxis. For this purpose, peripheral blood samples obtained from 154 patients during the reaction (acute phase) and at least 14 days later (basal phase) were used.

Firstly, the consideration of baseline serum tryptase measurements was found to improve its use as diagnostic marker. On the other hand, a decrease in serum protein concentration and human serum albumin levels according to the severity of the reaction was described. These measurements would allow indirect quantification of the extravasation underlying anaphylaxis and are proposed as potential biomarkers. In turn, an increase in the hemoglobin beta subunit was detected independently of the severity of the reaction.

EVs from plasma were purified by ultracentrifugation and characterized by electron microscopy, Western blot and nanoparticle tracking analysis. Mass spectrometry screening discovered a panel of 99 differential proteins between acute and basal EVs. Similarly, the next generation sequencing analysis of circulating serum miRNAs described significant changes of 41 and 21 molecules in children with food reactions and in adults with drug anaphylaxis, respectively. From these high throughput studies, the CDC42, S100A9 and Ficolin 2 EV proteins and the miRNAs miR-21-3p, miR-487b-3p and miR-375-3p were validated in a larger cohort of patients with anaphylaxis, postulating them as potential biomarkers of the reaction. Moreover, EVs were isolated and characterized from serum and changes in its miR-21-3p and miR-375-3p levels were observed between acute and basal phases.

Systems biology analyses from the 99-EV proteins panel and from miR-21-3p, miR-487b-3p and miR-375-3p target genes, identified the involvement of these molecules in hallmark processes of anaphylaxis, principally the immune response. In addition, they were associated with the cardiovascular alterations underlying this pathological event. Functional studies determined monocytes as the peripheral blood mononuclear cell population that mainly captured patients' EVs. Furthermore, these particles were internalized by endothelial cells (ECs) and caused a loss of endothelial resistance. Moreover, ECs incubated under *in vitro* anaphylaxis conditions increased the intracellular levels of miR-21-3p and contributed to its release into the extracellular medium. Moreover, the miR-375-3p mimic partially blocked the cAMP-mediated stabilization of the endothelial barrier.



V. ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

3p	3 prima
5p	5 prima
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Nucleasa de ADN
ADNc	ADN copia
AGO	Proteínas Argonauta
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
Akt	Proteína quinasa B
AMPc	AMP cíclico
ANOVA	Análisis de varianzas
APRIL	Ligando inductor de la proliferación (<i>A proliferation-inducing ligand</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa III	Ribonucleasa III
ARNm	ARN mensajeros
ARNt	ARN de transferencia
ASH	Albúmina sérica humana
BAFF	Factor activador de linfocitos B (<i>B-cell activating factor</i>)
BMP	Proteína morfogénica ósea (<i>Bone morphogenetic protein</i>)
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine serum albumin</i>)
C1P	Ceramida 1-fosfato
Cap	Caperuza
CEs	Células endoteliales
CML	Células de músculo liso
CMLV	Células de músculo liso vasculares
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
CO₂	Dióxido de carbono
COVID-19	Enfermedad por coronavirus de 2019
COX2	Ciclooxigenasa 2
CPA	Células presentadoras de antígenos
DTT	Ditiotreitol
ECGF	Factor de crecimiento de células endoteliales (<i>Endothelial cell growth factor</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
eIF4	Factor de iniciación eucariota 4F (<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>)
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial (<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>)
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Sorter</i>
FBS	Suero bovino fetal (<i>Fetal bovine serum</i>)
Fc	Frecuencia cardíaca
FC	Tasa de cambio (<i>Fold change</i>)
FcγR	Receptores de alta afinidad de la IgG
FcεRI	Receptores de alta afinidad de la IgE
FDR	Tasa de error (<i>False discovery rate</i>)
GAR	Anticuerpo secundario de cabra específico frente a conejo (<i>Goat anti-rabbit</i>)
GO	Objeto genético (<i>Gene ontology</i>)
H1R	Receptor 1 de la histamina (<i>Histamine 1 receptor</i>)
H₂O milli-Q	Agua ultrapura
H2R	Receptor 2 de la histamina (<i>Histamine 2 receptor</i>)
HBB	Subunidad β de la hemoglobina (<i>Hemoglobin subunit β</i>)
hEGF	Factor de crecimiento epidérmico humano (<i>Human epidermal growth factor</i>)
hFGF-B	Factor básico de crecimiento de fibroblastos humano (<i>Human fibroblastic growth factor</i>)
HMDD	<i>human miRNA disease database</i>
HMVEC-D	CEs microvasculares de dermis humana (<i>Human microvascular ECs-dermal</i>)
HMVEC-L	CEs microvasculares de pulmón humano (<i>Human microvascular ECs-lung</i>)
IBP	Inhibidores de la bomba de protones
IECAS	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
IgE	Inmunoglobulina E

ABREVIATURAS

IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (<i>Insulin-like growth factor 1</i>)
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucinas
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible (<i>Inducible nitric oxide synthase</i>)
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
JAK2	Janus quinasa 2
kDa	Kilodalton
lei	Lámina elástica interna
log	Logaritmo
LPS	Lipopolisacárido/Endotoxina
LXR	Receptor X del hígado (<i>Liver X receptor</i>)
MHCII	Moléculas de histocompatibilidad de tipo II (<i>Major histocompatibility complex type II</i>)
miARNs	microARNs
MISEV2018	<i>Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018</i>
MRGPRX2	Receptores de mastocitos X2 acoplados a proteínas G (<i>Mas-related G-protein coupled receptor member X2</i>)
MVB	Cuerpo multivesicular (<i>Multivesicular body</i>)
N	Número de pacientes/réplicas experimentales
NF-κB	Factor nuclear κB (<i>Nuclear factor κB</i>)
NGS	Secuenciación de nueva generación (<i>Next generation sequencing</i>)
NK	Células asesinas naturales (<i>Natural killer</i>)
NO	Óxido nítrico (<i>Nitric oxide</i>)
ns	No significativo
NTA	Análisis del trazado de nanopartículas (<i>Nanoparticle tracking analysis</i>)
p70S6K	Proteína ribosómica S6 quinasa β-1 (<i>Ribosomal protein S6 kinase β-1</i>)
PAF	Factor activador plaquetario (<i>Platelet-activating factor</i>)
PAS	Presión arterial sistólica
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica (<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PC	Componente principal (<i>Principal component</i>)
PCA	Análisis de componentes principales (<i>Principal component analysis</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PE	Péptidos específicos
PFA	Paraformaldehído
PI3K	Fosfoinositol-3-quinasa
PM	Peso molecular
poliA	Poli-adeninas
qPCR	PCR cuantitativa (<i>quantitative PCR</i>)
R3-IGF-1	Recombinante análogo del factor de crecimiento similar a la insulina-I con sustitución de Arginina por Glutamina en la posición 3
RAM	Anticuerpo secundario de conejo específico frente a ratón (<i>Rabbit anti-mouse</i>)
RANK	Receptor activador del NF-κB (<i>Receptor activator of NF-κB</i>)
RAR	Receptores del ácido retinoico (<i>Retinoic acid receptor</i>)
RIQ	Rango intercuartílico
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
RP-LC-MS/MS	Cromatografía líquida en fase reversa con espectrometría de masas en tándem (<i>Reversed-phase liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción inversa (<i>Reverse transcription</i>)
RXR	Receptor X de retinoides (<i>Retinoid X receptor</i>)
SBA	Análisis de biología de sistemas (<i>System biology analysis</i>)
Scramble	miARNs controles fluorescentes
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEM	Error estándar de la media (<i>Standard error of the mean</i>)

ABREVIATURAS

SOCS1	Supresor de la señalización de citocinas 1 (<i>Suppressor of cytokine signaling 1</i>)
SpO₂	Saturación de oxígeno
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3 (<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>)
TA	Temperatura ambiente
ta	Túnica adventicia
Tc	Linfocitos T citotóxicos
TEER	Resistencia eléctrica transendotelial (<i>Transendothelial electrical resistance</i>)
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante- β 1 (<i>Transforming growth factor beta 1</i>)
Th	Linfocitos T colaboradores (<i>T helper cells</i>)
ti	Túnica íntima
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
tm	Túnica media
TNFα	Factor de necrosis tumoral- α (<i>Tumor necrosis factor-α</i>)
TNFR	Superfamilia de receptores de TNF (<i>TNF receptor superfamily</i>)
TNFR I	Receptor de TNF I (<i>TNF receptor I</i>)
TNFR II	Receptor de TNF II (<i>TNF receptor II</i>)
Treg	Linfocitos T reguladores
TW	<i>Transwell</i>
UCM	Universidad Complutense de Madrid
UMIs	<i>Unique Molecular Identifiers</i>
UTR	Región no traducida (<i>untranslated región</i>)
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VEs	Vesículas extracelulares
WAO	Organización mundial de la alergia (<i>World allergy organization</i>)
XPO5	Exportina 5

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Anafilaxia

La anafilaxia es la manifestación más grave de los trastornos alérgicos. Concretamente, este evento patológico consiste en una reacción de hipersensibilidad sistémica y potencialmente mortal, que se caracteriza por un desarrollo rápido y problemas de las vías respiratorias o de la circulación que suelen ir asociados, aunque no siempre, a alteraciones en la piel y las mucosas¹. La reacción anafiláctica es provocada fundamentalmente por la exposición a varios alérgenos, entre los cuales los más comunes son los alimentos, los medicamentos y los venenos de himenópteros. Sin embargo, cuando se desconoce la causa de la anafilaxia se denomina idiopática^{1,2}.

La distribución etiológica de este evento patológico difiere en función de la edad, ya que los medicamentos son los desencadenantes más comunes en adultos, mientras que los alimentos son los principales causantes en niños^{3,4}. Estos alérgenos dan lugar a la activación de las células efectoras de la reacción, las cuales liberan una gran variedad de mediadores que provocan los diferentes síntomas y signos de la anafilaxia (**Figura 1**). Entre estos, la piel y las mucosas son los afectados con mayor frecuencia (80-90%), seguidos del respiratorio (70%), del cardiovascular y gastrointestinal (45%) y, por último, del nervioso (15%)⁵. Sin embargo, la prevalencia de los síntomas también varía en función de la edad, siendo las manifestaciones respiratorias más comunes en niños, mientras que las cardiovasculares son más habituales en adultos^{5,6}.

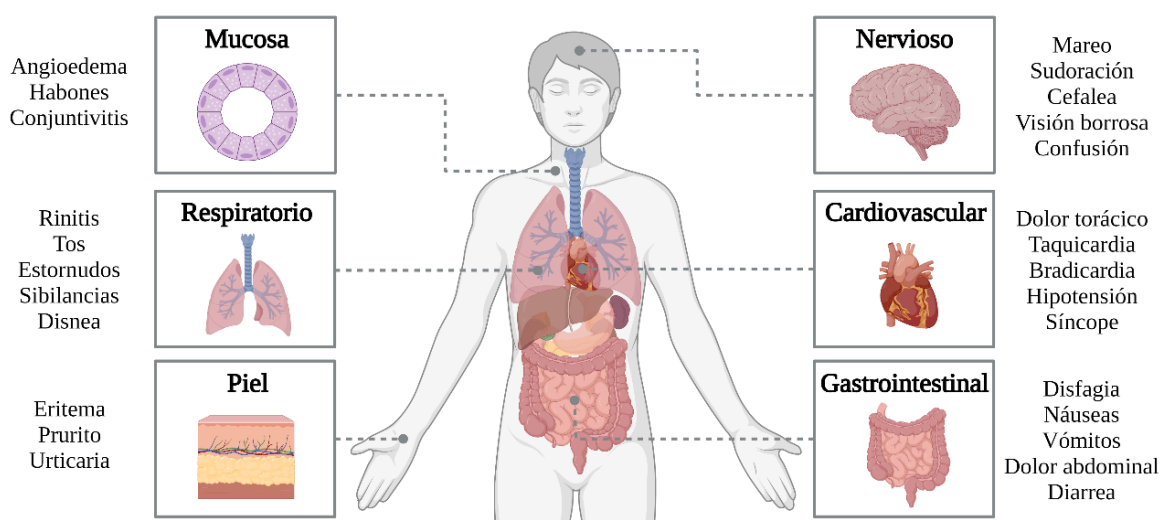


Figura 1. Síntomas clínicos de la anafilaxia en función de los órganos o sistemas afectados.

Por otra parte, la anafilaxia, además de ser una preocupación sanitaria, también supone un problema socioeconómico. Precisamente, una investigación realizada en Estados Unidos en 2016 estimó que este evento patológico genera un gasto anual de 1.800 millones de dólares entre costes directos e indirectos⁷. Sin embargo, son necesarios más estudios para confirmarlo, ya que estos valores podrían estar mal calculados debido a los problemas diagnósticos que presenta la anafilaxia y al hecho de que los pacientes suelen padecer otras enfermedades, como el asma, lo que aumentaría el gasto indirecto⁷⁻⁹. Por lo tanto, existe la imperiosa necesidad de mejorar la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la reacción anafiláctica.

1.1.1. Epidemiología

La incidencia y la prevalencia de las enfermedades alérgicas han aumentado en las últimas décadas, tanto en las reacciones causadas por alimentos como en las provocadas por medicamentos^{10,11}. A su vez, también se ha descrito un incremento del número de caso de anafilaxia durante los últimos años^{1,6,12,13}. No obstante, los datos actuales se considera que están subestimados debido a la falta de una definición común para este evento patológico, a las discrepancias en las metodologías utilizadas en los estudios epidemiológicos y/o a los problemas en su diagnóstico, como la ausencia de biomarcadores precisos^{1,14}.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Alergia (WAO), en 2020, la incidencia de la anafilaxia fue de entre 50 y 112 casos por cada 100.000 habitantes, mientras que su prevalencia era del 0,3%-5,1%¹. Sin embargo, estos valores cambian en función del área geográfica ya que esta reacción es más habitual en los lugares donde hay menos horas de luz. Además, estos datos también varían dependiendo del género y la edad, siendo más frecuentes en hombres hasta los 10-15 años y en mujeres a partir de este periodo^{6,12}.

La tasa de mortalidad de la anafilaxia no ha aumentado en la última década y continúa siendo baja, aunque los valores calculados cambian dependiendo del desencadenante: 0,05-0,51 fallecidos por cada millón de habitantes a causa de medicamentos, 0,03-0,32 por alimentos y 0,09-0,13 por veneno de himenópteros. No obstante, entre los factores que influyen en la mortalidad de las reacciones destaca el aumento de la edad de los individuos. Asimismo, se estima que la recurrencia de la anafilaxia se produce en el 26,5-54% de los pacientes entre 1,5 y 25 años después de la primera reacción. Sin embargo, estos datos también varían en función del alérgeno, siendo más común en los casos por alimentos que por medicamentos^{1,12}.

1.1.2. Bases moleculares de la reacción

La anafilaxia es el resultado de la liberación, por parte de las células efectoras de la reacción, de distintos mediadores que dan lugar a los signos y síntomas de este evento patológico. No obstante, la activación de estas células puede llevarse a cabo por diferentes mecanismos moleculares.

1.1.2.1. Mecanismos celulares y moleculares mediados por IgE

Entre las distintas vías de señalización molecular descritas en anafilaxia, aquella mediada por la inmunoglobulina E (IgE) es la principal en humanos¹⁵. Esta comprende dos fases: una primera de sensibilización tras la exposición al alérgeno y una segunda efectora después de la reexposición al antígeno en la que se activan las células efectoras dando lugar a la anafilaxia (**Figura 2**)^{15,16}.

En la sensibilización, el alérgeno (medicamentos, alimentos...) es capturado por las células presentadoras de antígenos (CPA), las cuales lo procesan hasta convertirlo en péptidos y acoplarlo a sus moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHCII). Tras esto, las CPA exponen el antígeno a los linfocitos T colaboradores (Th) activándolos e induciendo su diferenciación a un fenotipo Th2. A su vez, los linfocitos Th2 activados liberan varias citocinas que actúan sobre los linfocitos B estimulando su diferenciación a células plasmáticas y el cambio de isotipo a IgE. Estas células plasmáticas son las encargadas de secretar las IgE específicas que se unen, mediante su fracción constante, a los receptores de alta afinidad (FcεRI) presentes en la membrana de los mastocitos y los basófilos,

sensibilizándolos frente a ese alérgeno concreto^{15,17-19}. Sin embargo, los FcεRI también están presentes en otros tipos celulares como los neutrófilos, los eosinófilos, los monocitos, las células dendríticas o las plaquetas, aunque su papel en la anafilaxia aún no está claro²⁰.

Por otra parte, la fase efectora comienza cuando el alérgeno entra de nuevo al organismo y es reconocido por las IgE unidas a los receptores FcεRI de superficie de las células efectoras de la reacción. Este proceso provoca la activación y la degranulación de los mastocitos y basófilos induciendo la liberación de diferentes mediadores como la histamina, el factor activador plaquetario (PAF) y la triptasa que dan lugar a los signos y síntomas de la anafilaxia^{15,17-19}.

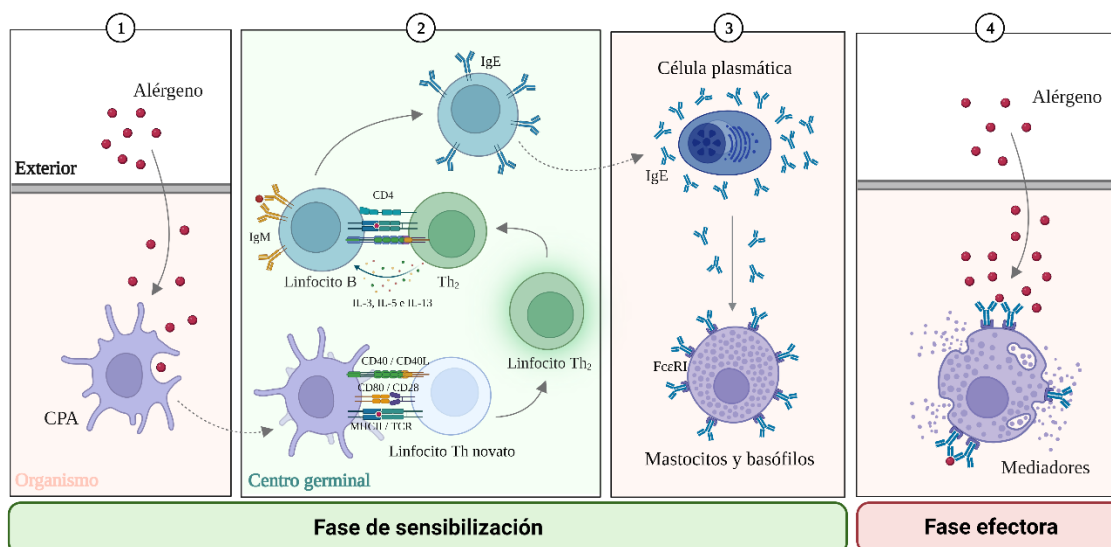


Figura 2. Mecanismos moleculares de las reacciones de hipersensibilidad de tipo I. (1) El antígeno es capturado por las CPA. (2) Las CPA migran a los centros germinales de los órganos linfoides donde presentan el antígeno a los linfocitos Th novatos, polarizándolos a un fenotipo Th2. Estos liberan varias interleucinas (IL-3, IL-5 e IL-13) que actúan sobre los linfocitos B induciendo la hipermutación somática y el cambio de isotipo de sus anticuerpos. (3) Los linfocitos B activados salen de los centros germinales y dan lugar a las células plasmáticas que liberan IgE, la cual se unirá a los mastocitos y los basófilos mediante sus receptores FcεRI, sensibilizándolos. (4) Cuando el alérgeno entra de nuevo en el organismo es reconocido por las IgE unidas a las células efectoras de la reacción produciendo su degranulación y la liberación de los mediadores.

1.1.2.2. Mecanismos celulares y moleculares independientes de IgE

Curiosamente, en algunos pacientes, después de sufrir una anafilaxia, no se observan niveles detectables de IgE específica frente al alérgeno que induce la reacción. Sin embargo, otros presentan valores elevados de esta molécula sin desarrollar ningún síntoma²¹⁻²³. Por lo tanto, deben de existir otras vías independientes o complementarias a la IgE implicadas en este evento patológico²⁴⁻²⁶.

Debido a la similitud entre los sistemas inmunitarios del humano y el ratón, el uso de modelos experimentales murinos ha sido crucial para dilucidar el papel de otros mecanismos moleculares subyacentes a la anafilaxia. Entre ellos, la vía de la inmunoglobulina G (IgG) destaca como el principal proceso inmunitario alternativo descrito en este evento patológico^{3,26,27}. No obstante, a diferencia de la IgE, las reacciones mediadas por IgG requieren mayores niveles de anticuerpo y antígeno específicos debido a la menor afinidad de sus receptores (FcγR) en comparación con los FcεRI²⁴. Los FcγR se encuentran en la superficie de los mastocitos, basófilos, neutrófilos, monocitos y macrófagos, conformando estos los principales tipos celulares activados por esta vía alternativa^{24,28-31}. Precisamente, se ha demostrado la implicación tanto de los monocitos como de los macrófagos en la

anafilaxia sistémica pasiva y activa^{15,32,33}. A su vez, los neutrófilos también se han postulado como un componente importante en el desarrollo de este evento patológico³⁴. La contribución de estas células se observó en modelos experimentales de ratón, lo que sugirió que una vía similar podría ser operativa en las reacciones humanas^{34,35}. En relación, estudios realizados en pacientes con anafilaxia demostraron una elevación de los niveles séricos de elastasa y mieloperoxidasa, los principales mediadores almacenados en los gránulos de los neutrófilos^{36,37}.

Asimismo, se han descrito otros mecanismos alternativos que pueden desencadenar este evento patológico. Por ejemplo, se ha demostrado que ciertos medicamentos, como los bloqueantes neuromusculares, son capaces de desencadenar directamente la liberación de mediadores por parte de los mastocitos a través de su unión a los receptores X2 acoplados a proteínas G (MRGPRX2) presentes en su superficie³⁸⁻⁴¹. Por otra parte, la activación del complemento da lugar a la formación de las anafilotoxinas (C3a, C4a y C5a), las cuales se pueden unir a los receptores de los mastocitos y los basófilos provocando su degranulación^{15,27,42}. No obstante, también se ha visto que existen otros elementos que pueden actuar como cofactores de la reacción anafiláctica, como el ejercicio físico, la temperatura o la radiación ultravioleta^{15,25,31}.

1.1.3. Diagnóstico

El diagnóstico de la anafilaxia se establece fundamentalmente en base a los síntomas clínicos del paciente. Sin embargo, este evento patológico presenta una gran variedad de manifestaciones, las cuales son comunes a muchas otras patologías^{3,14}. Además, el uso de algunos medicamentos enmascara los síntomas clínicos y en un 10-20% de los casos no se producen alteraciones cutáneas, dificultando el reconocimiento de la reacción^{1,5}. Todo esto, en conjunto, da lugar a que la anafilaxia esté infradiagnosticada y no se maneje adecuadamente en la práctica clínica^{3,14}.

Actualmente, el principal biomarcador utilizado para complementar el diagnóstico de la reacción anafiláctica es el incremento de la triptasa sérica, una molécula liberada por los mastocitos y los basófilos. Sin embargo, esta proteína no se eleva en gran parte de los casos. Además, sus niveles aumentan especialmente en los eventos más graves donde el diagnóstico clínico es claro y no es necesaria la confirmación molecular⁴³. Esto podría deberse al momento de la recogida de las muestras, ya que el pico de esta proteína se alcanza a las 2 horas de la reacción⁴⁴. Por lo tanto, su umbral diagnóstico ha sufrido varias modificaciones disminuyendo desde 15 µg/L hasta 11,4 µg/L⁴⁵. No obstante, diferentes estudios han demostrado la importancia de considerar el valor basal del paciente al menos 24 horas después del desarrollo de este evento patológico^{21,46}. En consecuencia, se han propuesto nuevos criterios diagnóstico teniendo en cuenta esta medida. Concretamente, la consideración de un aumento del 20% + 2 µg/L de los niveles de triptasa sérica durante la fase aguda respecto al momento basal reveló una mejora sustancial en el reconocimiento de la anafilaxia⁴⁷. A su vez, Borer-Reinhold *et al.* propusieron un incremento del 135% de los niveles de triptasa sérica durante la reacción en comparación con el estado basal para indicar la activación de los mastocitos en pacientes con anafilaxia por veneno de himenópteros⁴⁸.

Debido a la falta de eficacia de la triptasa en el diagnóstico de este evento patológico, se han evaluado otros potenciales marcadores como la histamina sérica, pero esta molécula tampoco se eleva en la mayoría de los pacientes con anafilaxia. Además, su vida media es

corta (10 a 60 minutos), ya que se metaboliza por la N-metiltransferasa y la diamida oxidasa dando lugar a metilhistamina. Esta última se puede medir en orina, aunque su capacidad diagnóstica y su asociación con la gravedad es aún peor^{3,49}. Por otra parte, también se ha considerado el uso del PAF como biomarcador ya que se eleva en el 60% de las reacciones moderadas, mientras que la histamina y la triptasa lo hacen en el 35% y 55% de los casos, respectivamente. Además, la histamina y la triptasa aumentan en el 61% y 75% de los pacientes graves, mientras que PAF lo hace en el 100%. Sin embargo, su vida media es muy corta (3 a 13 minutos) y, aunque potencialmente sería un mejor marcador molecular que la histamina y la triptasa, solo podría usarse en los casos de anafilaxia que surgen en el ámbito hospitalario, ya que en otras situaciones sus niveles sanguíneos desaparecerían antes de la recogida de las muestras⁵⁰.

1.1.4. Tratamiento

El tratamiento de primera línea de la anafilaxia es la administración de adrenalina intramuscular⁵¹. Esta medicación está indicada tras el reconocimiento de los síntomas debido a su capacidad para paliar rápidamente las alteraciones fisiopatológicas subyacentes a la reacción. Precisamente, su mecanismo de acción se produce principalmente en el sistema cardiovascular, donde previene el colapso cardíaco y mejora el flujo sanguíneo evitando el desarrollo de un choque anafiláctico y la muerte del paciente^{15,52}. A nivel molecular, la adrenalina actúa a través de los diferentes receptores adrenérgicos. En concreto, mediante los receptores α -adrenérgicos, este fármaco induce vasoconstricción, revertiendo así la vasodilatación periférica y aliviando la hipotensión^{53,54}. Además, a través de los receptores β -adrenérgicos estabiliza la barrera endotelial⁵⁵. A su vez, la adrenalina aumenta tanto la frecuencia como la fuerza de contracción cardíaca por los receptores β_1 . Sin embargo, por medio de los receptores β_2 restablece la broncoconstricción y reduce la liberación de mediadores inflamatorios por parte de las células efectoras de la reacción^{53,56,57}. No obstante, este fármaco no es eficaz en todos los casos. Concretamente, la adrenalina no está recomendada en los pacientes que padecen alguna cardiopatía y que se encuentran tratados con β -bloqueantes. En estos individuos, el medicamento utilizado es el glucagón, ya que revierte tanto la hipotensión refractaria como el broncoespasmo por una vía independiente de los receptores adrenérgicos^{1,58}.

Además, existen otras terapias complementarias para el tratamiento de la anafilaxia, pero que nunca deben sustituir al tratamiento de primera línea. Entre ellas se encuentran el suplemento de oxígeno en los casos de hipoxia, los agonistas de los β_2 adrenérgicos para revertir el broncoespasmo, las soluciones de cristaloides intravenosas para restaurar el volumen circulatorio, los antihistamínicos para ayudar a controlar los síntomas y los corticoides para prevenir las reacciones bifásicas y reducir la inflamación⁵⁹. A su vez, actualmente, se están llevando a cabo diferentes investigaciones sobre posibles fármacos alternativos para el tratamiento de la anafilaxia, aunque todavía no se han implementado en la práctica clínica. Entre ellos se encuentra el azul de metileno que actúa como inhibidor de las vías del óxido nítrico (NO) y que ha sido confirmado como un medicamento seguro para la hipotensión refractaria subyacente al choque anafiláctico⁶⁰. Por otra parte, se han obtenido resultados prometedores en modelos experimentales murinos de anafilaxia donde se ha demostrado que los antagonistas del PAF mitigan la gravedad y la duración de la reacción⁶¹.

1.2. Sistema cardiovascular

El sistema cardiovascular, o aparato circulatorio, está constituido por el corazón y una serie de vasos interconectados entre sí que distribuyen la sangre por el organismo. Este circuito cerrado comienza en el corazón desde donde emergen las arterias elásticas (aorta, arterias pulmonares, carótidas...), las cuales se ramifican formando las arterias musculares (arteria braquial, arteria femoral...) que dan lugar a las arteriolas. Estas últimas derivan en los capilares, que son las estructuras más delgadas del sistema cardiovascular y donde se lleva a cabo principalmente el intercambio de sustancias. A su vez, los capilares se unen dando lugar a las vénulas, las cuales pasan a formar las venas que son los vasos encargados del retorno de la sangre hasta el corazón (**Figura 3**)^{62,63}.

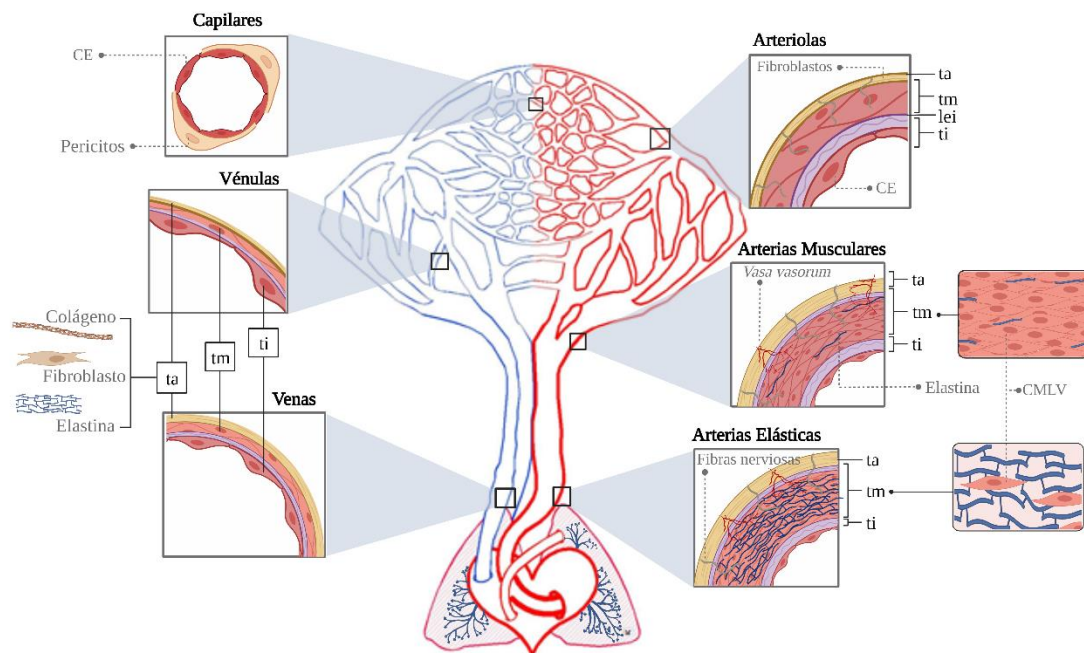


Figura 3. Estructura del árbol vascular. La túnica íntima (ti) es la zona interna de los vasos y está formada por una monocapa de CE que se encuentra sobre una membrana basal de tejido conectivo y una capa fibroelástica denominada lámina elástica interna (lei, color púrpura). La túnica media (tm) está compuesta por varias capas de células de músculo liso vascular (CMLV) y fibras de elastina. La túnica adventicia (ta) está formada por colágeno, fibroblastos y elastina. En rojo, los primeros grandes vasos que salen del corazón son las arterias elásticas. La tm de estos vasos es gruesa y está formada por varias láminas elásticas interconectadas por cordones de elastina y algunas CMLV. A su vez, la ta es relativamente delgada y presenta fibras nerviosas y *vasa vasorum*, los cuales irrigan la pared del vaso, ya que los nutrientes y el oxígeno no pueden llegar a todas las células por difusión. Cuando las arterias elásticas se ramifican el componente elástico comienza a ser sustituido por el muscular, dando lugar a las arterias musculares. Estructuralmente, su tm está formada por varias capas de CMLV y algunas fibras colágenas, elásticas y reticulares. Tras esto, las arterias musculares dan lugar a las arteriolas, unos vasos más estrechos que presentan una tm compuesta por unas pocas capas de CMLV. Además, su lei es fina y fenestrada y la ta no presenta *vasa vasorum*. Las arteriolas pasan a formar los capilares, los vasos más finos del organismo y donde se produce principalmente el intercambio de sustancias. Estos no presentan túnicas, pero pueden estar rodeados de pericitos que ayudan a regular su tono. En azul, la sangre vuelve al corazón a través del sistema venoso. Las vénulas están formadas por CE, una lámina basal, fibras de colágeno y pericitos. Cuando estos vasos se alejan de los capilares pasan a formar las vénulas musculares, las cuales presentan una tm compuesta principalmente por CMLV y, ocasionalmente, una ta. Por último, las venas devuelven la sangre al corazón y su estructura presenta las tres túnicas, pero son más delgadas que en el caso de las arterias. En estos vasos, la tm está compuesta por unas pocas CMLV⁶⁴.

Las funciones de este sistema son el transporte de sustancias que entran al cuerpo desde el exterior (principalmente nutrientes y oxígeno), el traslado de moléculas como las hormonas, la generación de fuerza hidráulica, la regulación de la temperatura, la modulación de la filtración glomerular en el riñón y la defensa del organismo mediante el transporte de células y mediadores inmunológicos⁶⁵.

En anafilaxia, el sistema cardiovascular es el principal afectado por los mediadores inmunológicos liberados durante la reacción. Precisamente, este se encuentra alterado en los casos leves y desempeña un papel fundamental en las reacciones más graves, donde puede desencadenarse el choque anafiláctico^{18,66}. Además, el deterioro del sistema cardiovascular debido a la edad, a otras enfermedades y/o a la administración de diferentes tratamientos, como los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, son algunos de los factores de riesgo asociados a las anafilaxias más graves⁶⁷⁻⁶⁹. Por lo tanto, es esencial comprender los mecanismos moleculares subyacentes a este sistema durante la reacción para poder desarrollar futuras estrategias diagnósticas y terapéuticas.

1.2.1. Célula endotelial

Prácticamente todos los vasos sanguíneos presentan una estructura común que se divide en tres capas: la túnica íntima, la túnica media y la túnica adventicia. Sin embargo, existen diferencias morfológicas y funcionales entre ellas⁶⁴. La túnica íntima consiste en una única y extensa monocapa de células endoteliales (CEs), denominada endotelio, que forma una barrera física entre la sangre y los tejidos por lo que el transporte selectivo de moléculas se lleva a cabo a través de ella⁷⁰. La integridad y estabilidad de esta estructura depende principalmente de dos vías: el citoesqueleto de actina-miosina y las uniones estrechas y adherentes⁷¹⁻⁷⁴. Además, el endotelio participa el transporte de células inflamatorias, el control del metabolismo, el mantenimiento de la homeostasis del organismo y la liberación de factores inflamatorios y de crecimiento^{75,76}. Por lo tanto, desempeña un papel fundamental en muchos procesos tanto fisiológicos como patológicos⁷⁷. Precisamente, un endotelio disfuncional es la causa de varias e importantes enfermedades cardiovasculares como la trombosis, la aterosclerosis o la hipertensión^{78,79}. Además, se ha visto que esta estructura también se encuentra dañada en pacientes con mastocitosis⁸⁰. A su vez, estudios previos han revelado una función del endotelio en la activación de los sistemas de coagulación, contacto y complemento durante la anafilaxia⁸¹⁻⁸³.

A nivel celular, las CEs son muy heterogéneas y su morfología, función y composición varían entre los distintos órganos y secciones de la vasculatura^{77,84-86}. La contracción de estas células y la consiguiente ruptura de la barrera endotelial en respuesta a los mediadores inflamatorios ocurre principalmente en la microvasculatura⁸⁷⁻⁸⁹. Por otra parte, las CEs también contribuyen de manera efectora a la modulación del tono vascular mediante la síntesis y liberación de sustancias vasoactivas⁹⁰. Entre ellas, el principal mediador vasodilatador producido por estas células es el NO⁹¹⁻⁹³. Asimismo, en situaciones inflamatorias agudas, como la enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19), las CEs sintetizan varias moléculas que participan en la tormenta de citoquinas⁹⁴. En consecuencia, estas células pueden actuar como efectoras y receptoras durante la reacción anafiláctica desempeñando un papel crucial en las bases moleculares subyacentes a este evento patológico.

1.2.2. Fisiopatología cardiovascular en anafilaxia

Varios de los mediadores liberados por las células efectoras de la reacción ejercen su acción sobre el sistema cardiovascular provocando las distintas alteraciones fisiopatológicas subyacentes a la anafilaxia (**Figura 4**)⁶⁴. Entre ellos, la histamina y el PAF, se han descrito como inductores de la permeabilidad vascular⁹⁵. Esto conduce a un aumento de la extravasación al espacio tisular y a la consiguiente reducción del volumen circulante⁹⁶. Por

otra parte, los mediadores anafilácticos también pueden contribuir a una pérdida de la resistencia vascular periférica, dando lugar a vasodilatación. Precisamente, esta alteración se ha observado en los pacientes con manifestaciones cardiovasculares graves, como la hipotensión⁹⁷⁻⁹⁹. Sin embargo, el descenso de la tensión arterial se ha asociado tanto a la extravasación como a la pérdida del tono vascular⁹⁸. En cambio, en las reacciones graves, también se ha caracterizado una vasoconstricción torácica de las arterias pulmonares y coronarias favoreciendo el colapso cardíaco¹⁰⁰⁻¹⁰².

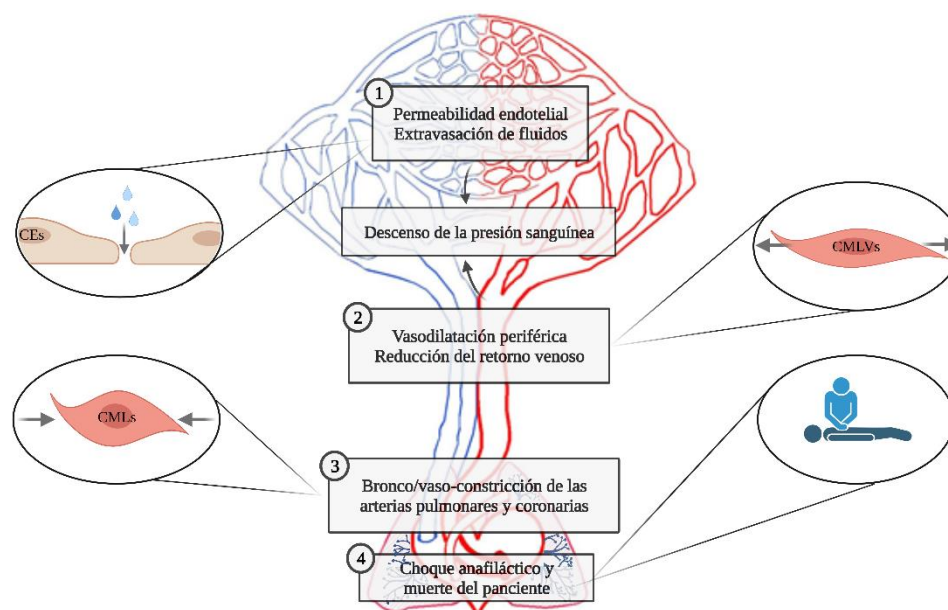


Figura 4. Fisiopatología cardiovascular de la anafilaxia. Esquema de las alteraciones cardiovasculares en función de los vasos/órganos afectados. (1) Aumento de la extravasación vascular - microcirculación (capilares y vénulas). (2) Vasodilatación (disminución de la resistencia vascular) - vasos periféricos. (3) Vasoconstricción torácica - arterias coronarias y pulmonares. (4) Choque anafiláctico - corazón. CEs: células endoteliales, CMLVs: células de músculo liso vascular, CMLs: células de músculo liso.

Todos estos procesos alteran el flujo sanguíneo y producen un deterioro de la homeostasis vascular que puede dar lugar al choque anafiláctico^{103,104}. La extravasación exacerbada de líquidos, en combinación con la pérdida de resistencia vascular periférica, reduce el retorno venoso al corazón. Además, el flujo sanguíneo se redirige desde las zonas superficiales a los órganos vitales disminuyendo la temperatura corporal. No obstante, esto es insuficiente para satisfacer las demandas metabólicas del organismo. Por otra parte, la constricción de las arterias pulmonares, junto con la broncoconstricción de las vías respiratorias, conduce a una menor captación de oxígeno. En consecuencia, para compensar esta hipoxia, la respiración se vuelve rápida y profunda y la frecuencia cardíaca aumenta (taquicardia). Sin embargo, si no se palian estos síntomas, se alcanza una segunda fase caracterizada por bradicardia, la cual puede derivar en el colapso cardíaco y la muerte del paciente^{103,105-107}.

1.2.3. Permeabilidad vascular en anafilaxia

La extravasación de fluidos ha sido asociada desde hace años con la fisiopatología de la anafilaxia¹⁰⁸. Precisamente, un estudio llevado a cabo por Fisher en 1986 demostró, mediante medidas de los niveles de hemoglobina, que durante la reacción anafiláctica se producía una transferencia de hasta un 35% del volumen circulante al espacio extracelular en los primeros 10 minutos tras la exposición al alérgeno⁹⁸. A su vez, otro estudio realizado en modelos experimentales murinos determinó que la permeabilidad vascular inducida por la histamina, y asociada a la anafilaxia, ocurría mayoritariamente en las vénulas postcapilares¹⁰⁹. Estos

vasos son los principales implicados en la extravasación de leucocitos a los tejidos ya que su endotelio es muy sensible a los estímulos inflamatorios y presenta unas uniones muy lábiles¹¹⁰. Concretamente, una investigación realizada en células humanas demostró mediante ensayos de permeabilidad *in vitro* que las CE de la microvasculatura son las únicas respondedoras a los mediadores anafilácticos⁹⁶.

La apertura de la barrera endotelial se produce durante los primeros segundos de la reacción provocando una fuga del contenido vascular hacia los tejidos. Pasado este tiempo, el endotelio se cierra, recuperando su estado normal¹¹¹. Cuando esto ocurre, de acuerdo con el principio de Starling, la presión oncótica sigue siendo mayor que la presión tisular, por lo que el líquido puede volver a los vasos por difusión. Sin embargo, la mayoría de las proteínas no pueden atravesar la barrera debido a su tamaño y permanecen en el espacio extravascular^{112,113}. Entre ellas, la albúmina sérica humana (ASH), la cual supone por sí sola un 50% del total de las proteínas séricas, únicamente retorna al sistema circulatorio a través de los vasos linfáticos, por lo que se retiene más tiempo en el compartimento tisular^{113,114}.

La elevada extravasación del líquido al espacio tisular contribuye a la formación de edemas en las vías respiratorias y puede provocar enfisema pulmonar¹¹⁵. Precisamente, un estudio llevado a cabo en 50 pacientes con anafilaxia idiopática demostró que la obstrucción de las vías respiratorias superiores estaba fuertemente asociada con el edema laríngeo, lo que conducía a la asfixia¹¹⁶. Además, las investigaciones realizadas en modelos animales de ratas con anafilaxia revelaron una asociación entre la extravasación de las vías respiratorias y la broncoconstricción grave¹¹⁷. Por otra parte, el angioedema y la urticaria, los síntomas más comunes de este evento patológico, también implican salida del líquido vascular y se caracterizan por una hinchazón temporal y localizada^{103,118}. Precisamente, el angioedema puede afectar a todas las capas de la piel y a las paredes viscerales, así como al sistema respiratorio y al tracto gastrointestinal^{103,119,120}. En concreto, un estudio llevado a cabo en pacientes con reacciones mediadas por cacahuetes sugirió que la mayor parte de la extravasación ocurría en el intestino, contribuyendo a la aparición de los síntomas gastrointestinales¹²¹. Asimismo, también se describió un edema intestinal difuso en un paciente con anafilaxia inducida por fármacos¹²². Por otra parte, se observó angioedema de las vías respiratorias superiores o edema pulmonar en una de cada dos biopsias obtenidas a partir de pacientes fallecidos por anafilaxia, demostrando la imperiosa necesidad de controlar la permeabilidad vascular subyacente a la reacción⁶⁶.

1.3. Vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares (VEs) son estructuras lipídicas liberadas por las células y se clasifican, según su tamaño y biogénesis, en tres subtipos fundamentalmente: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos¹²³. Sin embargo, aunque presentan diferentes características, su distinción sigue siendo difícil¹²⁴.

El interés por las VEs ha aumentado en los últimos años debido a su implicación en la comunicación intercelular. Estas partículas pueden contener distintas moléculas entre las que se incluyen proteínas, lípidos y ácidos nucleicos¹²⁴. Sin embargo, se han descrito variaciones en su carga relacionadas con diferentes enfermedades inflamatorias y alérgicas^{125,126}. Además, las VEs son muy estables y se encuentran presentes en todos los fluidos biológicos por lo que se postulan como unos biomarcadores prometedores¹²⁷.

1.3.1. Biogénesis de las vesículas extracelulares

El mecanismo mediante el cual la célula produce y libera las VEs al espacio extracelular difiere en función de los distintos tipos de vesículas (**Figura 5**)¹²⁸.

Los exosomas son VEs de entre 30 y 100 nm cuya biogénesis comienza cuando la membrana plasmática de la célula se invagina formando el endosoma temprano. Esta estructura, durante su proceso de maduración, puede llevar a cabo otra invaginación de su membrana dando lugar a vesículas intraluminales en su interior. Cuando esto ocurre pasa a llamarse cuerpo multivesicular (MVB) y puede seguir dos vías, una en la cual se unirá a los lisosomas degradando su contenido y otra donde se fusionará con la membrana plasmática secretando las vesículas al espacio extracelular (**Figura 5A**). Este proceso de liberación de los exosomas en algunas células se lleva a cabo de manera dependiente de los niveles de calcio, mientras que en otras ocurre de forma constitutiva, por lo que no se regula por esta vía¹²⁹⁻¹³³.

En cambio, las microvesículas se generan directamente a partir de la membrana plasmática mediante un proceso de exocitosis y su longitud oscila entre 0,1 y 1 μm de diámetro (**Figura 5B**)¹²⁴. La formación de estas VEs requiere de cambios en la concentración intracelular de calcio para modular la curvatura y rigidez de la membrana¹³⁴.

Por otra parte, los cuerpos apoptóticos se liberan como resultado de las células apoptóticas (**Figura 5C**)¹³⁵. La apoptosis es un proceso de muerte celular que inicia con una condensación de la cromatina nuclear y termina con la fragmentación de la célula en estas vesículas¹³⁶. Por lo tanto, mientras que los otros tipos de VEs se secretan a partir de células vivas, los cuerpos apoptóticos se liberan solamente durante la muerte celular programada. Estas partículas presentan un tamaño de entre 1 y 4 μm ¹³⁵. Sin embargo, también se han observado vesículas de entre 50 y 500 nm que parecen derivar de la ruptura de la membrana durante la apoptosis^{130,137,138}.

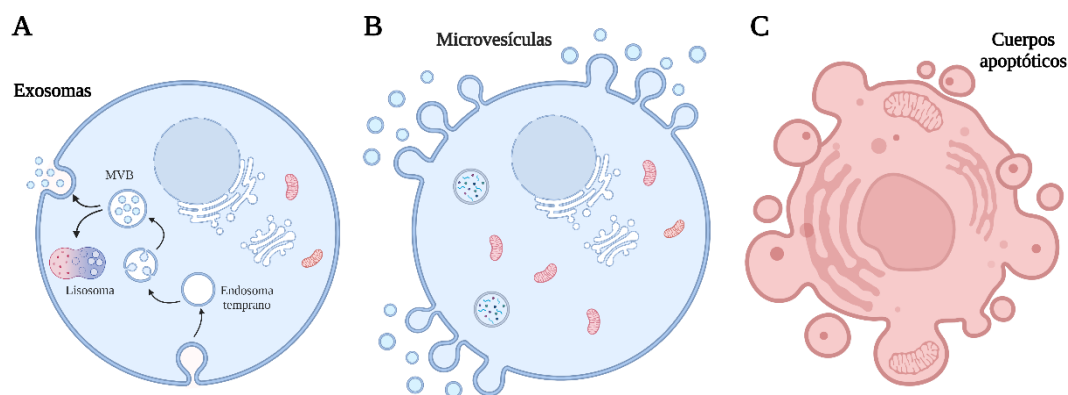


Figura 5. Biogénesis de las VEs. Mecanismos por los cuales se producen (A) los exosomas, (B) las microvesículas y (C) los cuerpos apoptóticos.

1.3.2. Mecanismos de acción y funciones de las vesículas extracelulares

Las VEs participan en la comunicación célula-célula actuando como mensajeros moleculares tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Precisamente, estas partículas pueden ejercer su acción sobre la propia célula que las ha producido de manera autocrina o sobre otras cercanas de forma paracrina. Además, también pueden ser transportadas mediante la sangre u otros fluidos e interactuar con células que se encuentran a grandes distancias de su lugar de origen^{124,139}.

INTRODUCCIÓN

Una vez en el espacio extracelular, las VEs ejercen su acción sobre las células diana de diferentes formas (**Figura 6**): por contacto directo a través de sus proteínas de membrana, por su fusión con la membrana plasmática integrándose en ella y liberando su carga, o por su endocitosis por parte de la célula diana donde se unirán con la membrana del endosoma secretando su contenido al citoplasma^{124,132,140}. Entre estos procesos, aquellos que internalizan las VEs son necesarios para que las moléculas presentes en su interior, como los ácidos nucleicos, puedan llevar a cabo su acción en la célula diana¹⁴¹.

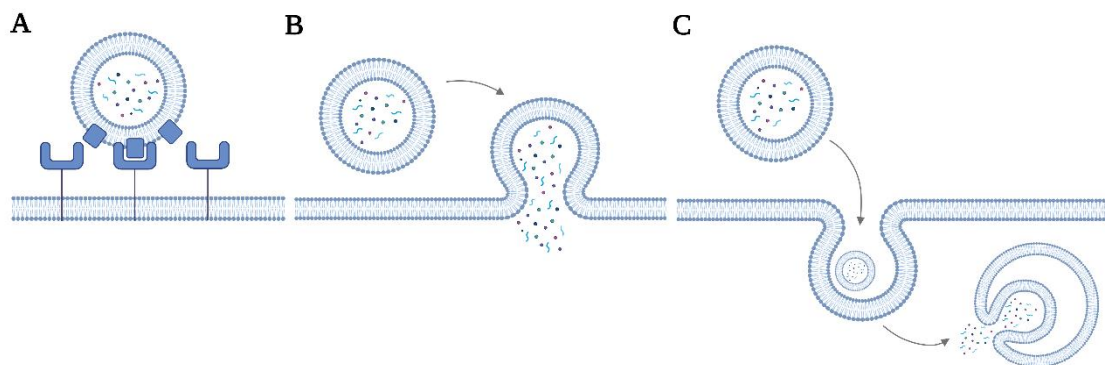


Figura 6. Mecanismos de acción de las VEs. (A) Contacto directo por sus proteínas de membrana. (B) Fusión con la membrana plasmática y liberación de su contenido. (C) Endocitosis y unión a la membrana del endosoma liberando las moléculas de su interior.

Por lo tanto, mediante estos mecanismos, las VEs regulan una gran variedad de procesos fisiológicos como la coagulación sanguínea, la inflamación, la proliferación de células madre o la comunicación neuronal^{135,142}. Precisamente, los exosomas son capaces de extravasar hacia los diferentes tejidos corporales y en condiciones inflamatorias pueden atravesar la barrera hematoencefálica actuando sobre las células del sistema nervioso¹⁴³⁻¹⁴⁶. Además, las VEs desempeñan una función crucial en la modulación de la respuesta inmunológica ya que pueden participar en la presentación antigénica, en la polarización de la respuesta hacia un determinado fenotipo o en su inhibición ejerciendo un efecto tolerogénico^{124,147}.

No obstante, las VEs también se han relacionado con otras situaciones patológicas. En concreto, se ha visto que las células cancerosas pueden secretar vesículas que contribuyen a la progresión del tumor ya que inducen la transformación de las células malignas, promueven la angiogénesis y tienen una actividad inmunosupresora^{124,140,147}. Además, se ha demostrado su implicación en el asma y en distintas enfermedades alérgicas¹⁴⁸. Precisamente, las microvesículas liberadas por los linfocitos T activados pueden inducir la degranulación y la liberación de citocinas por parte de los mastocitos¹⁴⁹. A su vez, los exosomas secretados por los linfocitos B pueden provocar la proliferación de los linfocitos Th y estimular su diferenciación hacia un fenotipo Th2¹⁵⁰. Por otra parte, se ha descrito que los exosomas derivados de los eosinófilos contribuyen a la patogénesis del asma¹⁵¹. Además, las VEs son capaces de estimular la secreción de citocinas inflamatorias durante esta patología¹⁵². En cambio, se ha atribuido cierta capacidad antialérgica a los exosomas derivados de mastocitos, los cuales tienen receptores FcεRI y pueden competir por la unión de IgE libre. Concretamente, en un modelo murino de asma, los ratones tratados con estas vesículas mostraron una disminución en los niveles de histamina en pulmón, IgE sérica y de citocinas implicadas en la respuesta Th2¹⁵³. Por lo tanto, la participación de las VE en el desarrollo de las enfermedades alérgicas ha sido ampliamente demostrado. Sin embargo, su papel en la anafilaxia, así como su implicación en las bases moleculares de la reacción, se desconoce completamente.

1.3.3. Vesículas extracelulares como biomarcadores

Las VEs se han postulado como una fuente prometedora de biomarcadores para el diagnóstico de varias enfermedades, aunque la mayoría de los estudios existentes se han focalizado en el cáncer^{124,127}. Precisamente, ya se han comercializado pruebas diagnósticas para esta patología basadas en los exosomas circulantes en sangre¹⁵⁴.

Las VEs presentan varias ventajas como marcadores moleculares. En concreto, estas partículas reflejan el estado de la célula que las libera permitiendo diferenciar entre condiciones normales y patológicas¹²⁷. Además, se pueden obtener de forma fácil y no invasiva, ya que se encuentran en muchos fluidos corporales como la sangre, la orina, el esperma o la saliva¹²⁴. Asimismo, son muy estables y protegen su contenido de la degradación. En consecuencia, su uso como biomarcador puede estar basado en los cambios en su concentración y/o en su composición¹⁵⁵. Por lo tanto, caracterizar las VEs de los pacientes con anafilaxia permitiría identificar diferentes candidatos moleculares para el diagnóstico de este evento patológico.

1.4. MicroARNs

Los microARNs (miARNs) son moléculas pequeñas de ácido ribonucleico (ARN) no codificante (~22 nucleótidos) que regulan la traducción de los ARN mensajeros (ARNm)¹⁵⁶. A su vez, comprenden una de las familias génicas más abundantes y están muy conservadas entre especies. Actualmente, se han descritos más de 2.500 miARNs en humanos, de los cuales, la mayoría (30%), se encuentran codificados en secuencias intrónicas^{157,158}.

El interés por los miARNs también ha aumentado en los últimos años. Estas moléculas se pueden encontrar circulando libremente en la sangre, unidas a proteínas o encapsuladas en las VEs¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Por lo tanto, también participan en la comunicación célula-célula y modulan varias funciones como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis, manteniendo el equilibrio fisiológico del organismo. Sin embargo, su desregulación se ha visto implicada en muchas enfermedades humanas^{157,162}. Además, los miARNs se relacionan con el estado del individuo y son muy estables, lo que les convertiría en unos biomarcadores prometedores, aunque todavía no se han incorporado a la práctica clínica^{163,164}.

1.4.1. Biogénesis de los microARNs

Los genes de los miARNs se transcriben mayoritariamente por la ARN polimerasa II, dando lugar a un pri-miARN que presenta una forma de horquilla, una caperuza (Cap) en su extremo 5' (5p) y una cola de poli-adeninas (poliA) en el 3' (3p). Este transcrito permanece en el núcleo donde es procesado por el "microprocesador" formado por la ribonucleasa III (ARNasa III) Drosha y la proteína de unión a ARN de doble cadena DGCR8. El resultado de dichas modificaciones es un precursor de unos 60-70 nucleótidos que mantiene la forma de horquilla, llamado pre-miARN. Esta molécula es exportada desde el núcleo hasta el citoplasma por la exportina 5 (XPO5) donde posteriormente es procesada por otra ARNasa III, DICER, la cual se encuentra asociada a TRBP, otra proteína de unión a ARN. El resultado final es un miARN maduro dúplex de aproximadamente 22 nucleótidos cuyas cadenas se separan y se asocian por individual con las proteínas Argonauta (AGO) formando el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) (**Figura 7**)^{157,165,166}.

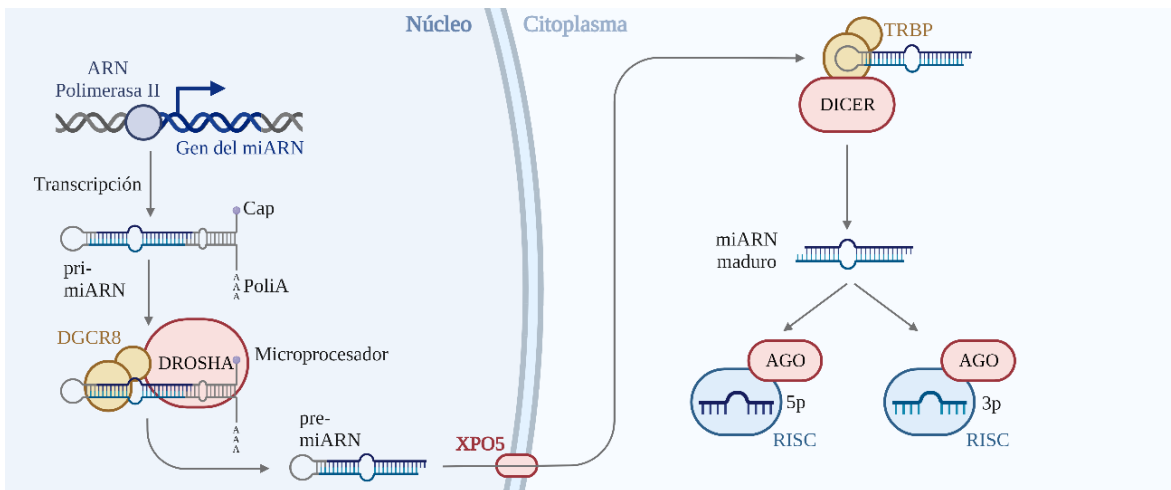


Figura 7. Biogénesis de los miARNs.

Anteriormente, se creía que solo una de estas hebras de ARN, denominada “guía”, se asociaba con las proteínas AGO para formar el RISC, mientras que la otra, llamada “pasajera”, se degradaba¹⁵⁷. Sin embargo, actualmente, se sabe que en muchos casos ambas hebras se mantienen y pueden ser cargadas en el RISC¹⁶⁵. Por lo tanto, para diferenciarlas, se nombran como 5p y 3p dependiendo de su orientación en el proceso de transcripción.

1.4.2. Mecanismo de acción y funciones de los microARNs

Todos los miARNs tienen una secuencia denominada “semilla” (nucleótidos del 2-8) en su extremo 5p que reconoce la región no traducida (UTR) del extremo 3p de su ARNm diana, permitiendo que el complejo RISC lo degrade o reprima su traducción^{157,166}. Este proceso depende de la complementariedad entre el miARN y su ARNm diana, ya que cuando no es total, se inhibe la traducción, mientras que cuando la complementariedad es total, la proteína AGO puede degradar el ARNm (Figura 8)¹⁶⁷. Además, un miARN es capaz de unirse a distintos ARNm y un mismo ARNm puede reconocerse por varios miARNs¹⁵⁶.

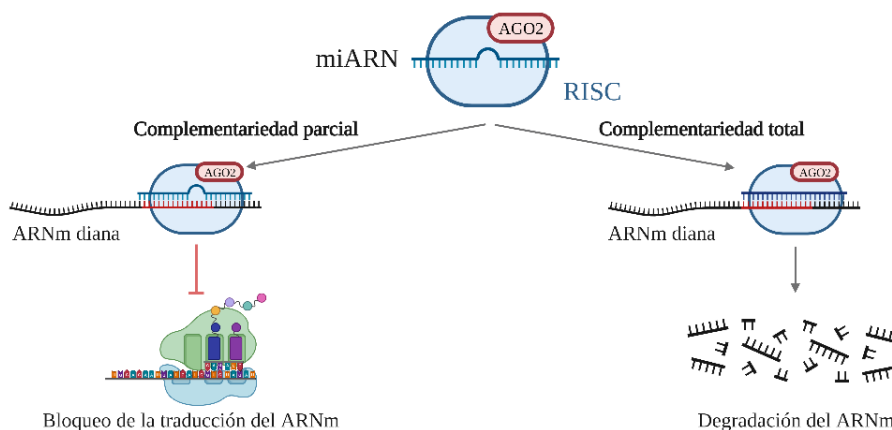


Figura 8. Mecanismo de acción de los miARNs en función del reconocimiento de su ARNm diana.

En consecuencia, estas moléculas mantienen la homeostasis del organismo regulando multitud de procesos fisiológicos¹⁶⁴. Sin embargo, de acuerdo con las bases de datos *miR2-Disease* y *human miRNA disease database* (HMDD), tanto el aumento como la disminución de sus niveles pueden asociarse con el desarrollo de enfermedades¹⁶². Precisamente, se han descrito cambios en los valores de miARNs en diferentes patologías alérgicas, donde se han relacionado sobre todo con el control de la inflamación subyacente¹⁶⁸. Un ejemplo de ello son el miR-26a y el miR-26b, los cuales regulan los niveles de la ciclooxygenasa 2 (COX2),

una enzima fundamental en este proceso inflamatorio y en la liberación de las citocinas implicadas¹⁶⁹.

En anafilaxia, actualmente, la mayoría de las investigaciones se han llevado a cabo en modelos experimentales murinos¹⁷⁰⁻¹⁷⁶. Los resultados obtenidos demostraron que tanto el miR-155 como el miR-126 regulaban la degranulación de los mastocitos controlando sus niveles de calcio a través de la vía de la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K)/ proteína quinasa B (Akt)^{170,171}. Además, el miR-182-5p, el miR-154-5p, el miR-135-5p y el miR-181a modulaban la inflamación alérgica subyacente a la anafilaxia¹⁷²⁻¹⁷⁵. Del mismo modo, se vio que el miR-122 participaba en la inhibición de este proceso mediante la regulación del supresor de la señalización de citocinas 1 (SOCS1) y de la Janus quinasa 2 (JAK2). A su vez, estas moléculas controlan la producción del factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1), un mediador antiinflamatorio¹⁷⁶. Sin embargo, los miARNs nunca se han estudiado en los pacientes con anafilaxia. Por lo tanto, debido a su papel en la comunicación celular y en la regulación de la inflamación alérgica, es esencial evaluar la función de estas moléculas en las bases moleculares subyacentes a la reacción anafiláctica.

1.4.3. MicroARNs como biomarcadores

Los miARNs han generado un gran interés como biomarcadores en el campo del diagnóstico molecular debido a que los cambios en sus niveles reflejan el estado fisiológico o patológico del individuo¹⁷⁷. Además, estas moléculas son muy estables y se pueden detectar en muchos fluidos biológicos, como la sangre, lo que permite la obtención no invasiva de las muestras¹⁷⁸. Asimismo, pueden recuperarse y analizarse a partir de tejidos fijados en parafina¹⁶⁵. Precisamente, su cuantificación se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una técnica cuya aplicabilidad como método diagnóstico se ha demostrado que es factible y asequible¹⁷⁹. Sin embargo, el uso de los miARNs como marcadores moleculares aún no ha sido implementado en la práctica clínica.

Estas moléculas han sido propuestas como biomarcadores de varias enfermedades alérgicas¹⁶⁸. En concreto, se describió que la medición conjunta de 6 miARNs (miR-125b, miR-16, miR-299-5p, miR-126, miR-206, y miR-133b) era capaz de diferenciar con una precisión del 91,1% los casos de rinitis alérgica respecto a los de asma¹⁸⁰. Además, el análisis de los niveles de miARNs en la mucosa nasal de los pacientes con rinitis alérgica reveló que el uso combinado de 3 de ellos (miR-126-5p, miR-19a-5p y miR-26a-5p) correlacionaba con la gravedad de la enfermedad y la diagnosticaba con un 89,6% de sensibilidad y 70% de especificidad¹⁸¹. Por otra parte, se observó que el perfil sérico de miARNs puede utilizarse para confirmar los casos de asma, así como clasificarlos en función de su gravedad¹⁸². Por lo tanto, caracterizar el perfil de miARNs séricos circulantes en los pacientes con anafilaxia podría proporcionar nuevos biomarcadores alternativos o complementarios para el diagnóstico de este evento patológico.



2. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

La caracterización de las proteínas, las VEs y los miARNs circulantes en muestras de pacientes con anafilaxia permitiría identificar biomarcadores alternativos o complementarios que mejoren el diagnóstico de la anafilaxia. Además, los miARNs y las VEs regulan una gran variedad de procesos fisiopatológicos relacionados con otras enfermedades, por lo que estudiar su papel en la reacción anafiláctica aumentaría el conocimiento de sus bases moleculares y facilitaría el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.



3. OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos principales de esta tesis han sido identificar nuevos biomarcadores y estudiar las bases moleculares de la anafilaxia. A su vez, se han desglosado en los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluar la capacidad diagnóstica de los diferentes umbrales propuestos para el uso de la triptasa sérica como biomarcador de la anafilaxia.
2. Cuantificar la extravasación vascular asociada a la anafilaxia mediante medidas de proteínas séricas circulantes.
3. Caracterizar el perfil proteico de las VEs obtenidas a partir de plasma de pacientes con anafilaxia.
4. Estudiar la función coordinada del panel de proteínas de las VEs y determinar la captación y el efecto de estas partículas en diferentes microambientes celulares.
5. Identificar los miARNs séricos circulantes en niños con anafilaxia mediada por alimentos y confirmar sus niveles en las VEs.
6. Evaluar los procesos regulados por el miR-21-3p y miR-487b-3p y analizar los cambios en sus niveles asociados con el nicho endotelial.
7. Identificar los miARNs séricos circulantes en adultos con anafilaxia mediada por medicamentos y confirmar sus niveles en las VEs.
8. Estudiar los procesos regulados por el miR-375-3p y evaluar su funcionalidad en la barrera endotelial.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Pacientes

4.1.1. Pacientes incluidos en el estudio

Para la realización de los estudios comprendidos en esta tesis se utilizaron muestras de sangre periférica obtenidas a partir de 154 pacientes con reacciones de hipersensibilidad (**Figura 9**). Estos sujetos fueron reclutados en diferentes hospitales españoles (Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Hospital Central de la Cruz Roja, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Clínica Universidad de Navarra, Hospital Ramón y Cajal, Hospital Reina Sofía de Córdoba y Hospital Universitario de Guadalajara) entre junio de 2016 y agosto de 2021. Las muestras se recogieron en los servicios de urgencias y/o como resultado de las pruebas de provocación realizadas en las unidades de alergología. Además, en todos los casos se llevó a cabo un seguimiento clínico del paciente y el diagnóstico se confirmó mediante pruebas cutáneas, mediciones de IgE específica y/o provocaciones.

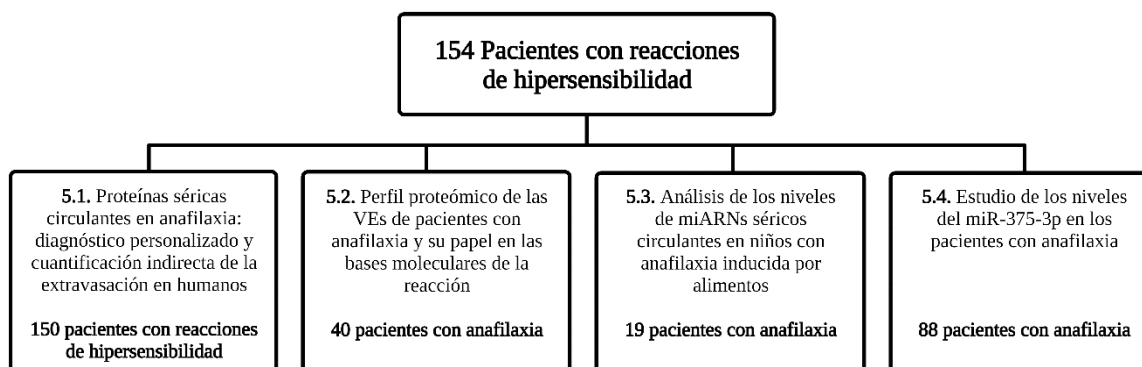


Figura 9. Organigrama de los pacientes utilizados en cada uno de los estudios incluidos en esta tesis.

La gravedad de las reacciones se determinó en función de los síntomas clínicos de los pacientes siguiendo los criterios de clasificación establecidos por Brown (**Tabla 1**)¹⁸³. En consecuencia, 38 de los eventos se catalogaron como leves (Grado 1), 86 como moderados (Grado 2) y 30 como graves (Grado 3). Sin embargo, sólo las reacciones de Grado 2 y Grado 3 se consideraron anafilaxia de acuerdo con las definiciones de la WAO y el *National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis*^{1,184}. Las características detalladas de cada paciente se muestran en el **Anexo I**.

	Grado	Órganos y/o sistemas afectados	Síntomas
1	Leve	Piel y tejidos subcutáneos	Eritema generalizado, urticaria, edema palpebral y/o angioedema
2	Moderado	Respiratorio, Gastrointestinal y/o Cardiovascular	Disnea, estridor, sibilancias, náuseas, vómitos, mareos, diaforesis, opresión torácica y/o dolor abdominal
3	Grave	Respiratorio, Nervioso y/o Cardiovascular	Cianosis o hipoxia ($SpO_2 \leq 92\%$), hipotensión (PAS < 90 mmHg), pérdida de conocimiento y/o incontinencia

Tabla 1. Criterios de clasificación de las reacciones de hipersensibilidad. SpO₂: saturación de oxígeno, PAS: presión arterial sistólica. Adaptada de Brown¹⁸³.

4.1.2. Comité ético

Todas las muestras biológicas y los datos clínicos de los pacientes se recogieron acorde a los protocolos éticos aprobados por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Fundación Jiménez Díaz (PIC38/2016, PIC142/2016 y PIC057-19).

La obtención de la sangre periférica se llevó a cabo siempre lo más rápido posible, sin poner en riesgo en ningún caso la vida de los pacientes y tomando las medidas clínicas oportunas de administración de fármacos cuando fuera necesario (adrenalina y/u otros). Además, las muestras y los datos clínicos se recogieron y registraron tras la firma de consentimiento

informado por parte de los donantes o de sus familiares (**Anexo II**). Los criterios de inclusión comprendieron la aceptación a participar en el estudio y un diagnóstico objetivo de la reacción, mientras que los criterios de exclusión fueron presentar alguna enfermedad de transmisión sanguínea o cualquiera patología psíquica que impidiese la aceptación del estudio.

4.1.3. Obtención de las muestras

De cada paciente se obtuvieron muestras de sangre periférica en 2 condiciones: una en el momento de la reacción (fase aguda) y otra transcurridos al menos 14 días (fase basal). Teniendo en cuenta la heterogeneidad de los individuos, la fase basal de cada uno de ellos se utilizó como control para su muestra aguda.

Para el procesamiento del suero y del plasma se utilizaron tubos *vacutainer* (BD). El usado para recoger el suero presentaba un tapón amarillo y un gel separador, mientras que el del plasma tenía el tapón de color malva e incluía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Una vez obtenida la sangre periférica, los tubos se invirtieron varias veces y se mantuvieron a 4°C hasta su posterior centrifugación a 1.200 g durante 10 minutos a 4°C. Tras esto, el suero y el plasma se alicuotaron en Eppendorf de 0,5 ml y se almacenaron a -80°C hasta su ulterior uso (**Figura 10**). Sin embargo, en la población pediátrica solo se recogieron muestras séricas.

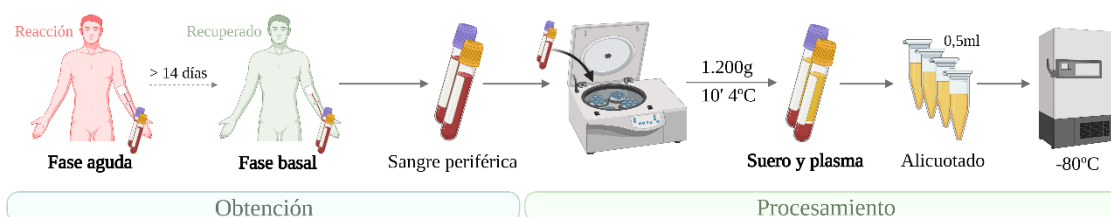


Figura 10. Representación esquemática de la obtención y el procesamiento de las muestras de suero y plasma.

4.2. Determinación de proteínas séricas

Todos los procesos realizados para la determinación de proteínas séricas circulantes se resumen en la **Figura 11**.

4.2.1. Medidas de triptasa sérica

Los niveles de triptasa ($\mu\text{g/L}$) se midieron a partir de 300 μl de suero mediante un *ImmunoCAP Phadia 1000* (Thermo Scientific) (**Figura 11A**). Todas las determinaciones se llevaron a cabo en el servicio de análisis clínicos del Hospital Fundación Jiménez Díaz.

4.2.2. Cuantificación de la concentración de proteínas séricas

La concentración de proteínas séricas se evaluó a través del ensayo colorimétrico de Bradford¹⁸⁵. Para ello, se utilizaron placas de 96 pocillos (Thermo Scientific) donde se añadieron, por duplicado, 250 μl del reactivo *Coomassie Plus* (Thermo Scientific) y 5 μl de muestra. Los sueros se diluyeron (1:200) y, en todos los casos, las dos fases de cada paciente se analizaron juntas y en idénticas condiciones. Además, para la extrapolación de los resultados se utilizó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) con un rango de 1 hasta 0,0675 $\mu\text{g/ml}$ (Thermo Scientific). Finalmente, la absorbancia de todos los estándares y las muestras se midió a 595 nm en un espectrofotómetro *Infinite F200* (Tecan) (**Figura 11B**).

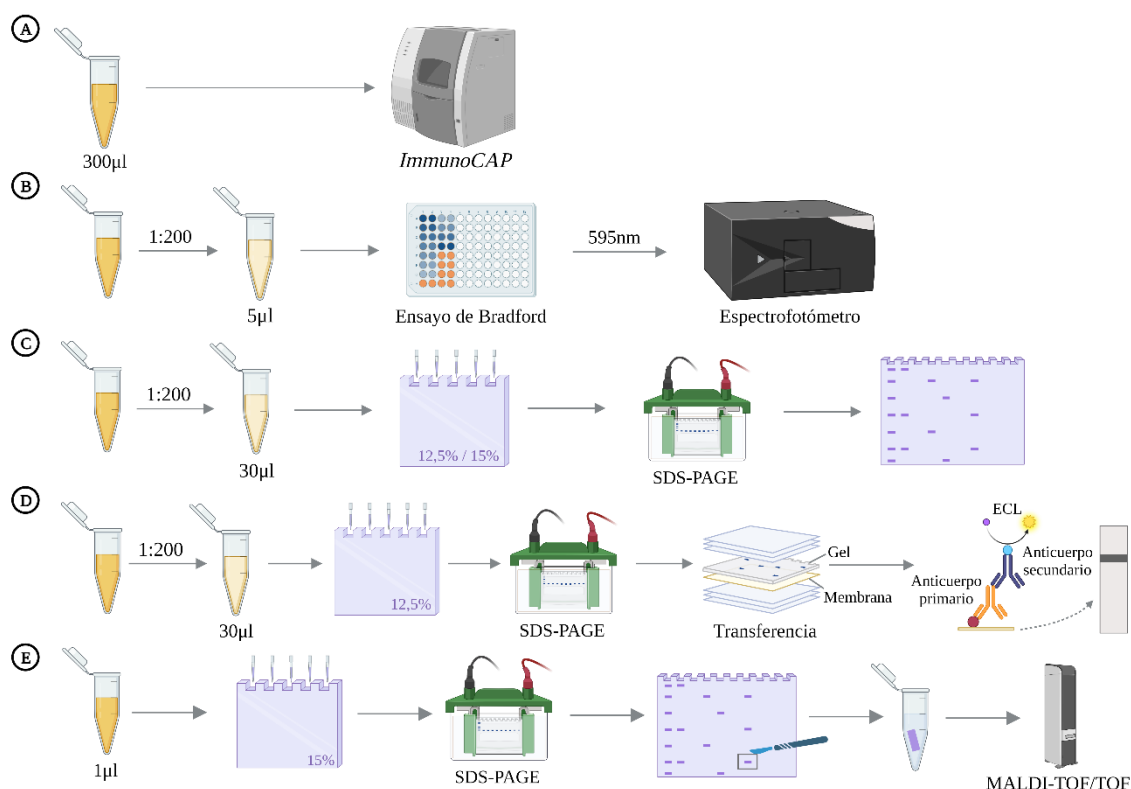


Figura 11. Resumen de los métodos utilizados para la determinación de las proteínas séricas circulantes. (A) Triptasa. (B) Concentración de proteínas. (C) Perfil de proteínas. (D) ASH. (E) HBB.

4.2.3. Evaluación del perfil de proteínas séricas

Para visualizar el perfil sérico, las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) utilizando el apartado *PowerPac™ Basic Power Supply* (Bio-Rad). Los geles se realizaron a una concentración del 12,5% y del 15% de acrilamida. A su vez, las muestras se prepararon en condiciones no reductoras utilizando 30 µl del suero diluido (1:200), 10 µl del tampón de carga (glicerol al 20%, 4 g de SDS y 1,51 g de hidrocloreuro de trisaminometano) y 2 µl del azul de bromofenol (Sigma). Tras esto, las proteínas se desnaturalizaron calentándolas durante 5 minutos a 95°C. En todos los casos, los sueros agudo y basal de cada paciente se analizaron juntos en el mismo gel y en condiciones idénticas. Además, para determinar el peso molecular se añadió un marcador comercial preteñido (Thermo Scientific).

Una vez finalizada la SDS-PAGE, la tinción y visualización del perfil de proteínas séricas se realizó incubando los geles durante toda la noche con 50 ml del reactivo *Coomassie Brilliant Blue G-250 Dye* (ICN Biomedicals, Inc.). Por último, se llevaron a cabo 5 lavados de 15 minutos con agua ultrapura (H₂O milli-Q) y los geles se escanearon con el instrumento *Amersham Imager 600* (GE Healthcare) (**Figura 11C**).

4.2.4. Determinación de los valores de albúmina sérica humana

Las muestras de suero para el análisis de la ASH se prepararon de acuerdo con lo descrito en el apartado anterior y se separaron por SDS-PAGE en geles a una concentración del 12,5%. Tras esto, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) mediante transferencia semi-seca utilizando el sistema *Trans-Blot Turbo Transfer* (BioRad). Posteriormente, se bloquearon las uniones inespecíficas de la membrana aplicando una solución de tampón fosfato salino (PBS) con Tween al 0,1% (Sigma) y gelatina al 5%

(Cultek) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Pasado este tiempo, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS-Tween al 0,1% y la membrana se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-ASH producido en nuestro laboratorio siguiendo la técnica descrita por Albar *et al.*¹⁸⁶. Este se preparó diluido 1:1.000.000 en una solución de PBS-Tween al 0,05% con gelatina al 1,5%.

Al día siguiente, la membrana se lavó de nuevo 5 veces con PBS-Tween al 0,1% y, para detectar la señal, se incubó durante 1 hora a TA con un anticuerpo secundario (Jackson Laboratory) de cabra específico frente a conejo (GAR), conjugado con peroxidasa y diluido a una concentración 1:5.000 en una solución de PBS-Tween al 0,05% con leche al 3%. Para finalizar, la membrana se lavó de nuevo 5 veces durante 5 minutos con PBS Tween al 0,1% y la proteína se detectó utilizando el reactivo quimioluminiscente *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (Thermo Scientific) en el sistema *Amersham Imager 600* (GE Healthcare) (**Figura 11D**). Tras esto, la cuantificación de las bandas se realizó mediante el programa *ImageJ*¹⁸⁷.

4.2.5. Evaluación de los niveles de la subunidad β de la hemoglobina

Los niveles de la subunidad β de la hemoglobina (HBB) se determinaron a partir de 1 μ l del suero de los pacientes. Al igual que en los casos anteriores, las muestras de ambas fases se analizaron juntas en el mismo gel y en condiciones idénticas. A su vez, las proteínas se separaron por SDS-PAGE en geles a una concentración del 15% y se tiñeron con el colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250 Dye* (ICN Biomedicals inc), como se ha descrito previamente (**Figura 11E**). Tras esto, los geles se escanearon en el sistema *Amersham Imager 600* (GE Healthcare) y la cuantificación de las bandas se realizó con el programa *ImageJ*¹⁸⁷.

4.2.6. Identificación mediante espectrometría de masas de proteínas extraídas de gel

Para la identificación y caracterización de la banda, las proteínas séricas se separaron por SDS-PAGE (15%) y se tiñeron con el reactivo *PageBlue Protein Staining Solution* (Fermentas International). Una vez visualizada, la banda de interés se recortó del gel con un bisturí estéril y se envió para su análisis al Servicio de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) (**Figura 11E**).

La proteína fue reducida, alquilada y digerida con tripsina según lo descrito por Sechi¹⁸⁸. Posteriormente, se recogió el sobrenadante y se colocó en una placa MALDI con una matriz de 3 mg/ml de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Sigma) y acetonitrilo al 50%. Tras esto, los análisis se realizaron en un espectrómetro de masas *MALDI-TOF/TOF 4800 Plus Proteomics Analyzer* (Applied Biosystems) en modo reflector, utilizando una polaridad positiva y con un voltaje de aceleración de 20.000 V. Además, todos los espectros de masas se calibraron internamente utilizando péptidos procedentes de la autodigestión de la tripsina.

Por último, para la identificación de la proteína, se buscó en la base de datos *SwissProt* restringiendo a la taxonomía humana (20370 secuencias; 11359082 residuos) y utilizando el programa *MASCOT 2.6* (<http://www.matrixscience.com>) a través del *Global Protein Server v3.6* (ABSciex).

4.3. Vesículas extracelulares

4.3.1. Purificación de vesículas extracelulares

La purificación de las VEs se llevó a cabo de diferentes formas en función de la muestra utilizada (**Figura 12**). Sin embargo, en todos los casos, se verificó su correcto aislamiento por microscopía electrónica, Western blot y análisis del trazado de nanopartículas (NTA), siguiendo las recomendaciones del *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018* (MISEV2018)¹⁸⁹. Las VEs purificadas se conservaron a 4°C hasta su visualización por microscopía electrónica, y a -20°C hasta su caracterización mediante Western blot y NTA.

4.3.1.1. Purificación de vesículas extracelulares a partir de plasma

La purificación de las VEs a partir de plasma se realizó mediante una serie de centrifugas y ultracentrifugas. Para ello, se centrifugaron 2 ml de cada muestra a 12.000 g durante 20 minutos a 10°C, se pasó el sobrenadante a los tubos de ultracentrífuga (Beckman Coulter) y se suplementó con PBS hasta alcanzar un volumen de 20 ml. A continuación, se ultracentrifugaron en la ultracentrífuga XL-80 (Beckman Coulter) con el rotor 70Ti (Beckman, Coulter) a 100.000 g durante 1 hora y 10 minutos a 10°C. Tras esto, para lavar las vesículas, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 20 ml de PBS y se volvió a centrifugar a 100.000 g durante 1 hora y 10 minutos a 10°C. Una vez finalizado, se eliminó el sobrenadante y el precipitado, donde estaban contenidas las VEs, se resuspendió en 100 µl de PBS y se conservó hasta su ulterior uso (**Figura 12A**).

4.3.1.2. Purificación de vesículas extracelulares a partir de suero

Las VEs de suero se purificaron utilizando el *miRCURY™ Exosome isolation Kit – Serum and Plasma* (Qiagen). En primer lugar, se centrifugaron 0,5 ml de cada muestra a 12.000 g durante 20 minutos a 10°C y se descartó el precipitado. Tras esto, se añadieron 200 µl del tampón de precipitado al sobrenadante y se incubó durante 3 horas a 4°C. Consecutivamente, se centrifugó la muestra a 1.500 g durante 30 minutos a TA y se eliminó el sobrenadante. Por último, se le añadieron 270 µl del tampón de resuspensión al precipitado, donde estaban contenidas las VEs, y se almacenó hasta su uso (**Figura 12B**).

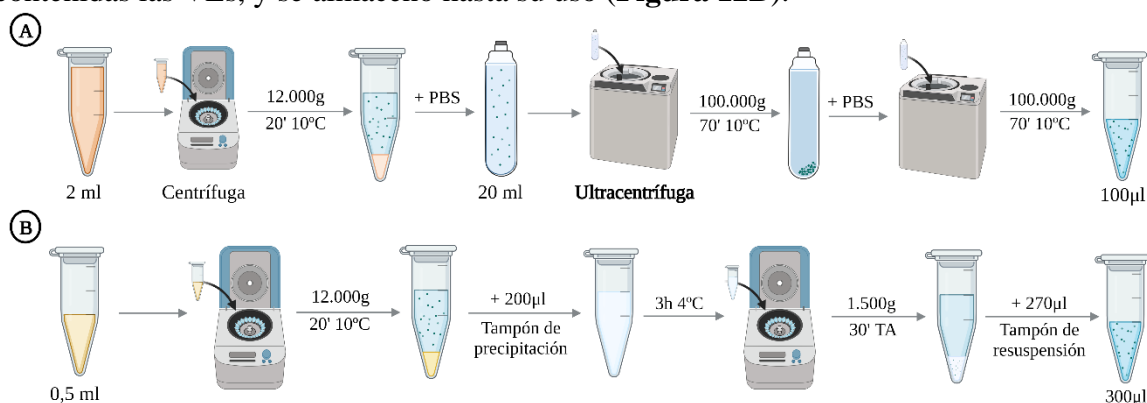


Figura 12. Descripción gráfica de los protocolos de purificación de las VEs en función de la muestra utilizada. (A) Plasma. (B) Suero.

4.3.2. Microscopía electrónica

La visualización de las VEs por microscopía electrónica se llevó a cabo a partir de 5 µl de las vesículas purificadas previamente y conservadas a 4°C. Para ello, se fijaron en 50 µl de PBS con paraformaldehído (PFA) al 2% (Sigma) durante 24 horas a 4°C y en agitación. Tras esto, las VEs se adsorbieron en rejillas de cobre/carbono (Fedelco) durante 3 minutos a TA,

se lavaron con agua durante 1 minuto y se contrastaron con acetato de uranilo al 1% durante 30 segundos. Después, las muestras se observaron en el microscopio electrónico de transmisión *JEOL 1010* (JEOL) de la Facultad de Químicas de la UCM empleando un voltaje de 100 kV. Por último, el análisis para la visualización y procesamiento de las imágenes se llevó a cabo utilizando el programa *Soft Imaging Viewer*.

4.3.3. Análisis del trazado de nanopartículas

El NTA de las VEs de plasma se llevó a cabo con el analizador de nanopartículas *ZetaView* de la empresa *Solmeclas Biotechnology Company*. Las vesículas se diluyeron en PBS hasta un volumen final de 1 ml y las concentraciones óptimas se determinaron evaluando previamente los niveles de partículas (140-200 partículas/cuadro). Al mismo tiempo, se seleccionaron los ajustes por defecto del instrumento para las VEs, los liposomas o las nanoesferas. Para cada medida, se realizaron dos ciclos escaneando 11 posiciones en cada uno y capturando 60 fotogramas por posición. Además, se ajustó para que la calidad de vídeo fuera alta.

Por otra parte, el NTA de las VEs de suero se realizó en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) con un sistema de caracterización de nanopartículas *NS500* (NanoSight) equipado con un láser azul (405 nm) y diluyendo las muestras 1:500.

4.3.4. Determinación del perfil proteico de las vesículas extracelulares

La determinación del perfil proteico de las VEs se realizó en el Servicio de Proteómica de la UCM. Para ello, se obtuvieron las VEs de plasma de 10 pacientes adultos con anafilaxia y se agruparon de dos en dos en cada una de las fases. Por lo tanto, el análisis se llevó a cabo de forma pareada a partir de 5 grupos de muestras agudas y basales (**Figura 13**).

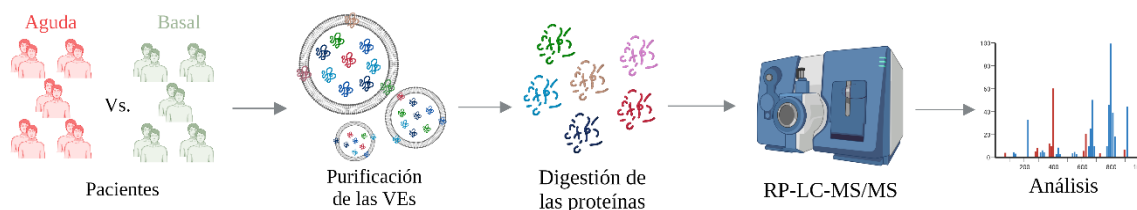


Figura 13. Representación esquemática de los métodos usados para caracterizar el perfil proteico de las VEs.

4.3.4.1. Digestión de las proteínas y pre-fraccionamiento de los péptidos

En primer lugar, para la digestión de las VEs, se redujeron las proteínas con ditioneitol (DTT) durante 1 hora a 37°C. Tras esto, se alquilaron con iodoacetamida durante 1 hora a TA en oscuridad y, finalmente, fueron digeridas toda la noche a 37°C con tripsina (Roche).

A su vez, los péptidos obtenidos de la digestión fueron pre-fraccionados mediante el uso de un *High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit* (Thermo Scientific). Estos se eluyeron en 7 fracciones y se resuspendieron en 12 µl de una solución compuesta por acetonitrilo al 2% y ácido fórmico al 0,1%. Por último, se almacenaron a -20°C hasta su análisis mediante espectrometría de masas.

4.3.4.2. Cromatografía líquida y análisis por espectrómetro de masas

Las fracciones de péptidos se analizaron mediante cromatografía líquida en fase reversa con espectrometría de masas en tándem (RP-LC-MS/MS). En concreto, se utilizó un sistema *EASY nLC 1000* (Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas *Q-Exactive HF* (Thermo Scientific) a través de una fuente de pulverización *Nano-Easy* (Thermo Scientific).

Para ello, los péptidos obtenidos se cargaron en una columna *Acclaim PepMap 100 Trapping column* (20 mm x 75 μm , con una resina C18 de 3 μm y con unos poros de 100 Å de tamaño) con un tampón A (fase móvil con acetonitrilo al 2% y ácido fórmico al 0,1%) y se separaron con una columna con una punta de pulverización integrada *Easy Spray Column* (500 mm x 75 μm , con una resina C18 de 2 μm y con unos poros de 100 Å de tamaño). Esta separación se llevó a cabo a un flujo constante de 250 nl/minuto durante 2 horas en un gradiente del 5 al 35% de tampón B (acetonitrilo al 100% y ácido fórmico al 0,1%) en tampón A.

4.3.4.3. Cuantificación de proteínas y análisis de datos

Todos los datos se adquirieron con el programa *Xcalibur 4.0*. La identificación de los péptidos a partir de los datos brutos para generar los archivos de resultados se llevó a cabo utilizando el motor de búsqueda *Mascot v. 2.6.1* a través del programa *Protein Discoverer 2.3* (Thermo Scientific). A su vez, estos fueron cargados en el programa *Proline 2.0* para la cuantificación de las proteínas mediante recuento espectral. Este método consiste en contar el número de espectros que coinciden con los péptidos de la proteína a la que pertenecen para medir la abundancia en las muestras. Sin embargo, solo se consideraron aquellos correspondientes a péptidos específicos pertenecientes a una proteína o a un grupo y se excluyeron los compartidos por diferentes grupos de proteínas.

Los datos obtenidos se confrontaron con la base de datos del Proteoma Humano UP000005640 (93804 secuencias) y con la de posibles contaminantes (247 secuencias). Además, se estimó la tasa de error (FDR) utilizando bases de dato señuelo. A su vez, las puntuaciones de *Mascot* se ajustaron mediante un algoritmo percolador y los criterios de aceptación para la identificación de proteínas fueron un FDR <1% y al menos un péptido único identificado con alto intervalo de confianza (CI >95%). Además, se descartaron todas las proteínas con menos del doble (aumento o descenso) de tasa de cambio (FC) entre las dos fases comparadas.

4.3.5. Determinación de los niveles de proteínas en las vesículas extracelulares

Los niveles de las proteínas de las VEs se determinaron mediante Western blot. Para ello, las muestras se prepararon en condiciones reductoras utilizando 30 μl de las VEs purificadas, 10 μl de tampón de carga, 2 μl de azul de bromofenol y 2 μl de β -mercaptoetanol (Sigma). Sin embargo, para el análisis del CD9 y CD63 se hicieron en condiciones no reductoras. Tras esto, las proteínas se separaron, detectaron y cuantificaron del mismo modo que lo descrito en el apartado “determinación de los niveles de ASH”. Sin embargo, en este caso, la membrana se bloqueó con una solución de PBS-Tween al 0,1% con leche al 5% (PanReac, Applichem).

Para evaluar la correcta purificación de las VEs se utilizaron los anticuerpos primarios anti-CD9, anti-CD63, anti-Sintenina 1 y anti-TSG101. Sin embargo, para la validación de las proteínas derivadas del estudio de proteómica se usaron los anticuerpos primarios anti-S100A9, anti-CDC42 y anti-Ficolina 2 (**Tabla 2**). La detección de la señal se llevó a cabo mediante el uso de los anticuerpos secundarios correspondientes: de conejo frente a ratón (RAM) o GAR (Jackson Laboratory). Por otra parte, los datos obtenidos en los estudios de validación se normalizaron respecto a la concentración de proteínas de las muestras debido a la ausencia de controles endógenos fidedignos.

Anticuerpo	Dilución	Tampón de dilución	Especie	Casa comercial
Anti-CD9	1:500	PBS-Tween 0,05%	Ratón	Invitrogen
Anti-CD63	1:500	PBS-Tween 0,05%	Ratón	Invitrogen
Anti-Sintentina 1	1:500	PBS-Tween 0,05%	Ratón	Novus Biologicals
Anti-TSG101	1:500	PBS-Tween 0,05%	Ratón	Abcam
Anti-S100A9	1:1000	PBS-Tween 0,05%	Conejo	Cell signaling
Anti-CDC42	1:1000	PBS-Tween 0,05%	Conejo	Cell signaling
Anti-Ficolina 2	1:1000	PBS-Tween 0,05%	Conejo	Abcam

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para detectar las proteínas de las VEs.

4.4. MicroARNs

4.4.1. Determinación del perfil de microARNs séricos circulantes

El perfil de miARNs séricos circulantes se determinó mediante secuenciación de nueva generación (NGS) a partir de muestras agudas y basales de 5 niños con anafilaxia inducida por alimentos y de 5 adultos con anafilaxia por medicamentos. Todo el procedimiento se llevó a cabo en el Servicio de Genómica de la empresa Qiagen y se resume en la **Figura 14**. Además, las 10 muestras de cada grupo fueron evaluadas en el mismo lote y en condiciones idénticas.

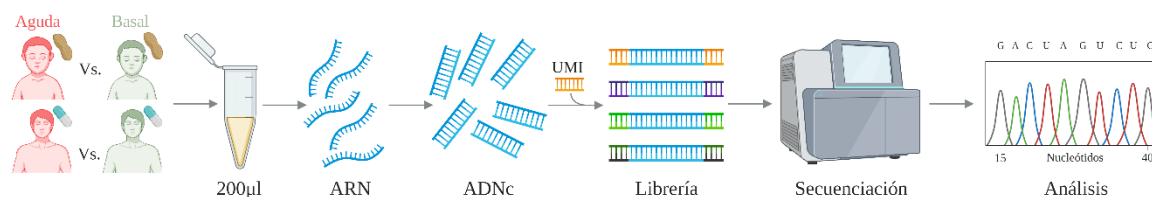


Figura 14. Resumen de los procedimientos realizados para determinar el perfil de miARNs séricos circulantes.

4.4.1.1. Preparación de las librerías

El ARN total se aisló a partir de 200 µl de suero mediante el *miRNeasy Serum/Plasma Kit* (Qiagen). Además, durante la purificación, se añadieron 52 secuencias exógenas que permitieron determinar la eficiencia de la extracción. A su vez, la preparación de las bibliotecas se realizó con el *QIAseq miRNA Library Kit* (Qiagen) a partir de 5 µl del ARN aislado. Este se retrotranscribió a ácido desoxirribonucleico (ADN) copia (ADNc), se amplificó mediante PCR (22 ciclos) y se purificó de las muestras.

Las librerías utilizadas fueron específicas para especies de ARN pequeñas comprendidas entre 15-40 nucleótidos y se realizaron (por un sistema *gel-free*) mediante la adición de *Unique Molecular Identifiers* (UMIs). De este modo, se marcan de forma única todos los fragmentos presentes en la muestra permitiendo una cuantificación real del número de moléculas existentes y reduciendo el sesgo originado por la presencia de duplicados generados en el paso de amplificación por PCR.

Los controles de calidad de la preparación de la biblioteca se determinaron utilizando el *Bioanalyzer 2100* o el *TapeStation 4200* (Agilent Technologies). Además, los niveles de miARNs de las librerías se normalizaron en ratios equimolares dependiendo de la calidad de los insertos y de las medidas de concentración. Tras esto, las bibliotecas se cuantificaron mediante PCR cuantitativa (qPCR) y se secuenciaron en un instrumento *Illumina NextSeq500* (10-12 millones de lecturas por muestra).

4.4.1.2. Análisis de los datos y mapeo de las lecturas

Los datos brutos fueron demultiplexados y se generaron archivos FASTQ para cada muestra utilizando el programa *bcl2fastq* (Illumina Inc.). A su vez, *Cutadapt* (1.11) se utilizó para

eliminar las secuencias adaptadoras y colapsar las lecturas por UMI con un script interno. Por último, estas lecturas se mapearon mediante el uso del programa *Bowtie2* (2.2.2). El criterio establecido para este mapeo fue una coincidencia perfecta con las secuencias de los controles de la técnica o con la base de datos *miRbase_20*. Además, no se permitieron errores ni más de 1 desajuste durante el mapeo del genoma.

4.4.2. Extracción de ARN

Todos los procedimientos de extracción de ARN se resumen en la **Figura 15**.

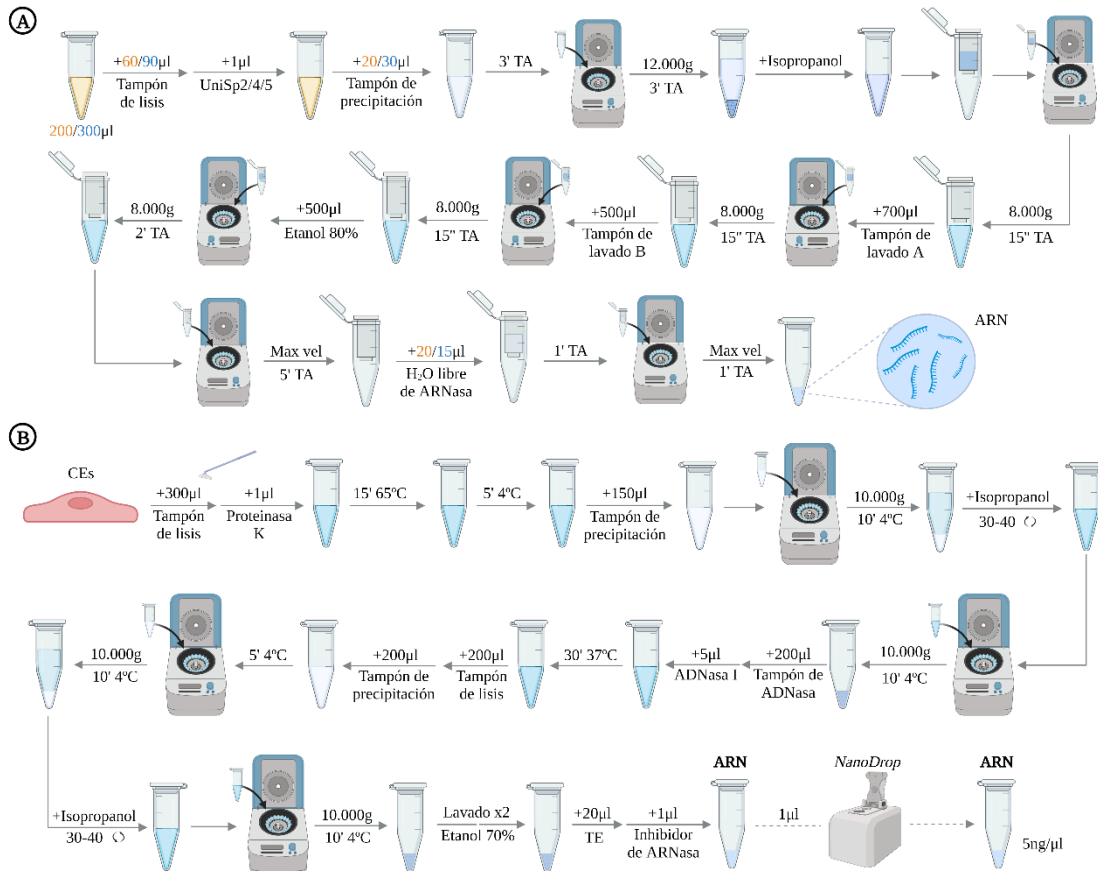


Figura 15. Descripción gráfica de los protocolos de extracción de ARN en función de la muestra utilizada. (A) Suero (naranja) y VEs (azul). (B) Células.

4.4.2.1. Extracción del ARN sérico

El ARN total, incluidos los miARNs, se aisló mediante el *miRNeasy Serum/Plasma Advanced kit* (Qiagen). Por cada 200 µl de muestra sérica, se añadieron 60 µl de tampón de lisis y 1 µl de la mezcla de UniSp2/4/5 (*miRCURY LNA RNA Spike-in kit*, Qiagen), unos miARNs sintéticos que sirven como control de calidad de la técnica. Tras esto, se incubaron durante 3 minutos a TA, se añadieron 20 µl del tampón de precipitación y se realizó una nueva incubación de 3 minutos a TA. A continuación, los tubos se centrifugaron a 12.000 g durante 3 minutos a TA, se cogió el sobrenadante, se mezcló con un volumen igual de isopropanol y se pasó a una columna específica donde quedó retenido el ARN tras una centrifugación a 8.000 g durante 15 segundos a TA. Posteriormente, se realizaron 2 lavados de 15 segundos a 8.000 g con tampones específicos contenidos en el kit, un tercero de 2 minutos con etanol al 80% y se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos para eliminar cualquier resto de tampón de lavado. Por último, se añadieron 20 µl de agua libre de ARNasa a la columna, se incubó durante 1 minuto a TA y se centrifugó a máxima

velocidad durante 1 minuto para eluir el ARN aislado a un tubo Eppendorf de 1,5 ml, el cual se almacenó a -80°C hasta su posterior utilización (**Figura 15A**).

4.4.2.2. Extracción del ARN de las vesículas extracelulares

El ARN de las VEs también se extrajo con el *miRNeasy Serum/Plasma Advanced kit* (Qiagen). Todo el proceso se llevó a cabo de igual forma que en el caso de la extracción del ARN sérico. Sin embargo, el volumen inicial fueron 300 µl, por lo que se utilizaron 90 µl del tampón de lisis y 30 µl del tampón de precipitación. Además, para concentrar más la muestra, la elución final del ARN se realizó con 15 µl de agua libre de ARNasa (**Figura 15A**).

4.4.2.3. Extracción del ARN intracelular

La extracción del ARN intracelular se realizó utilizando el *MasterPure Complete DNA and RNA Purification kit* (Lucigen). Las células se lisaron añadiendo 300 µl del tampón de lisis con 1 µl de Proteínasa K y utilizando un raspador. El lisado obtenido fue recogido e incubado a 65°C durante 15 minutos. Después, se mantuvo en hielo durante 5 minutos y se añadieron 150 µl del tampón de precipitación. Tras esto, cada muestra se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante. A este, se le añadió un volumen igual de isopropanol que se mezcló por inversión (30-40 veces) y se centrifugó de nuevo a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C. Seguidamente, se retiró el isopropanol y, para eliminar los restos de ADN, el precipitado se resuspendió en 200 µl del tampón específico para la nucleasa de ADN (ADNasa) con 5 µl de ADNasa I libre de ARNasa. Consecutivamente, las muestras fueron incubadas a 37°C durante 30 minutos y, tras este tiempo, se añadieron 200 µl del tampón de lisis y 200 µl del tampón de precipitación. Después, se pasaron a hielo 5 minutos y se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C. Tras esto, se aisló el sobrenadante, se le añadió un volumen igual de isopropanol y se mezcló por inversión (30-40 veces). Posteriormente, se centrifugó de nuevo a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C y se retiró el isopropanol con pipeta. El precipitado se lavó dos veces con etanol al 70% y, tras eliminarlo, se resuspendió en 20 µl de tampón TE (trisaminometano 10 mM y EDTA 1 mM) con 1 µl de inhibidor de ARNasa. Por último, las muestras de ARN se cuantificaron mediante espectrofotometría utilizando un *NanoDrop* (Thermo Scientific), se llevaron a una concentración de 5 ng/µl y fueron almacenadas a -20°C hasta su ulterior uso (**Figura 15B**).

4.4.3. Transcripción inversa

El ARN total se retrotranscribió mediante el uso del *miRCURY LNA RT kit* (Qiagen). Para ello, por cada muestra, se añadieron 2 µl del tampón específico de la reacción, 4,5 µl de agua libre de ARNasa, 1 µl de la mezcla de enzimas, 2 µl del ARN obtenido previamente en la extracción y 0,5 µl del UniSp6, un miARN sintético que se utiliza como control de calidad de la transcripción inversa (RT).

Una vez realizada la mezcla, se colocaron las muestras en el *PTC-100 Thermal Cycler* (MJ research, Inc) donde se llevó a cabo la RT durante 60 minutos a 42°. Posteriormente, se inactivó la reacción pasándolas a 95°C durante 5 minutos y el ADNc obtenido se conservó a -20°C hasta su posterior utilización.

4.4.4. Cuantificación de los niveles de microARNs

La cuantificación de los niveles de los miARNs se realizó por qPCR usando el *miRCURY LNA SYBR Green PCR kit* (Qiagen). En primer lugar, el ADNc obtenidos de la RT se diluyó

(1:8 en VEs y 1:30 en suero y células) y se analizó por duplicado en placas de PCR (Thermo Scientific). En cada pocillo se añadieron 3 μ l de la muestra diluida, 5 μ l del *2x miRCURY SYBR Green Master Mix* (Qiagen), 1 μ l de agua libre de ARNasa y 1 μ l de la sonda (Qiagen) que se quisiera medir (**Tabla 3**). Entre ellas, se usaron los oligonucleótidos correspondientes a los controles de la extracción, los UniSp2, UniSp4 y UniSp5, que deben aparecer con una diferencia escalonada de entre 5 y 7 ciclos cada uno. Además, el UniSp6 se utilizó como control de calidad de la RT y su amplificación se debería detectar alrededor del ciclo 18. Asimismo, el miR-451a y el miR-23a-3p sirvieron como controles endógenos de la hemólisis y cuando hubo una diferencia mayor de 7 ciclos entre ellos (miR-23a-3p – miR-451a) se descartó la muestra. A su vez, el miR-30e-5p fue sugerido por el NGS como el mejor endógeno para la normalización de los datos (miR-30e-5p – miR-diana). Por último, se seleccionaron 12 miARNs diana para estudiar sus niveles séricos: miR-21-3p, miR-487b-3p, miR-191-5p, miR-4433b-5p, miR-483-3p, miR-433-3p, miR-211-5p, miR-139-5p, miR-133a-3p, miR-885-3p, miR-375-3p y miR-193b-5p.

Sonda	Referencia	Sonda	Referencia
UniSp2	YP00203950	UniSp4	YP00203953
UniSp5	YP00203955	UniSp6	YP00203954
hsa-miR-23a-3p	YP00204772	hsa-miR-451a	YP02119305
hsa-miR-30e-5p	YP00204714	hsa-miR-21-3p	YP00204302
hsa-miR-487b-3p	YP00204489	hsa-miR-191-5p	YP00204306
hsa-miR-4433b-5p	YP02118899	hsa-miR-483-3p	YP00204012
hsa-miR-433-3p	YP00204036	hsa-miR-211-5p	YP00204009
hsa-miR-139-5p	YP00205874	hsa-miR-133a-3p	YP00204788
hsa-miR-885-3p	YP00204136	hsa-miR-375-3p	YP00204362
hsa-miR-193b-5p	YP00204065		

Tabla 3. Sondas utilizadas para el análisis de los miARNs mediante qPCR.

La cuantificación y el análisis de la fluorescencia se llevó a cabo en los aparatos *LightCycle96 Real Time PCR System* (Roche Life Science) y *QuantStudio 12K Flex* (Thermo Scientific) siguiendo un protocolo compuesto por una preincubación durante 2 minutos a 95°C, 45 ciclos de amplificación a 56°C 60 segundos y 95°C 10 segundos donde se mide la fluorescencia, una fase de *melting* a 95°C 5 segundos, 60°C 60 segundos y 95°C 1 segundo para inactivar la reacción y una última a 37°C durante 30 segundos para enfriar la placa. Tanto el diseño de la placa como el estudio de los valores obtenidos se realizaron con los programas *LightCycler 96 SW 1.1* y *QuantStudio 12K Flex Software v1.24*. A su vez, para el análisis de los resultados se hizo el promedio de los duplicados y se aplicó el método de $2^{-\Delta Ct}$ para cuantificar los diferentes datos obtenidos, ya que seguían una distribución logarítmica¹⁹⁰.

4.5. Análisis de biología de sistemas

En todos los casos, el análisis de biología de sistemas (SBA) se llevó a cabo *in silico* utilizando el programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) de Qiagen. Este, proporcionó diferentes categorías funcionales relacionadas con un listado específico de genes seleccionados previamente. Entre ellas, se consideraron las “principales enfermedades y funciones”, las “principales enfermedades y trastornos” y las “vías de señalización canónicas”.

Para el estudio de las VEs se mapearon los genes correspondientes a las proteínas identificadas por espectrometría de masas. Sin embargo, en el análisis de los miARNs, se incluyeron todos los genes diana con más de un 50 de puntuación en la base de datos *miRDB*

(<http://mirdb.org/>)¹⁹¹. En ambos casos, los genes identificados fueron mapeados frente a su correspondiente objeto genético (GO) en la *Ingenuity Pathway Knowledge Base*. A su vez, el IPA calculó su relación con una determinada función biológica asignándole una puntuación (*z-score*) y computó si se encontraba previsiblemente más aumentada ($z > 0$) o disminuida ($z < 0$). Además, evaluó la significancia de este cambio mediante la prueba de Fisher a una cola.

Los análisis de componentes principales (PCA) y los mapas de calor se realizaron a través de la herramienta web *ClustVis* (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>)¹⁹². Además, las búsquedas bibliográficas manuales se llevaron a cabo en las bases de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>) y Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). A su vez, las ilustraciones e imágenes incluidas en esta tesis se desarrollaron con Biorender previa suscripción para su exportación (<https://app.biorender.com/>).

4.6. Cultivos celulares

Todos los cultivos celulares se desarrollaron en condiciones de esterilidad y se incubaron en una atmósfera humidificada, a 37°C y con un 5% de dióxido de carbono (CO₂). Además, el conteo de las células se llevó a cabo mediante la cámara de Neubauer (BRAN) añadiendo 90 µl de Azul de Tripán (Sigma) a 10 µl de la muestra.

4.6.1. Células endoteliales

Los cultivos celulares se desarrollaron a partir de dos nichos endoteliales distintos: células endoteliales microvasculares de pulmón humano (HMVEC-L) y células endoteliales microvasculares de dermis humana (HMVEC-D). En todos los casos, el mantenimiento se realizó siguiendo los protocolos proporcionados por la casa comercial (Lonza).

En concreto, las HMVEC-L (CC-2527) y las HMVEC-D (CC-2543) se crecieron y expandieron mediante el uso del *EGT-2MV BulletKit Medium* (Lonza). Este contiene medio basal EGM-2 suplementado con suero bovino fetal (FBS), hidrocortisona, factor básico de crecimiento de fibroblastos humano (hFGF-B), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), recombinante análogo del factor de crecimiento similar a la insulina-I con sustitución de Arginina por Glutamina en la posición 3 (R3-IGF-1), ácido ascórbico, factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) y sulfato de gentamicina/anfotericina (GA-1000). Además, se enriqueció con un 20% de FBS, con 10 µl/ml de heparina y con 5 µl/ml del factor de crecimiento de células endoteliales (ECGF).

4.6.2. Células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se purificaron por densidad a partir de 5 ml de sangre de donantes no atópicos (**Figura 16**). Para ello, a la muestra se le añadió un volumen igual de PBS, se agregaron 5 ml de *Pancoll* (PAN-Biotech) y se centrifugó a 1.800 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 minutos a TA. A su vez, esta centrifugación se realizó en ausencia de frenos del rotor para evitar la mezcla de las fases. Tras esto, el anillo donde estaban contenidas las PBMC se pasó a otro tubo y se lavó en dos ocasiones añadiendo 10 ml de PBS y centrifugando a 1.500 rpm durante 10 minutos a TA. Por último, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 (EuroClone) suplementado con 10% de FBS, penicilina/estreptomicina a 100 µg/ml (Sigma) y L-glutamina a 2 mM (Invitrogen).

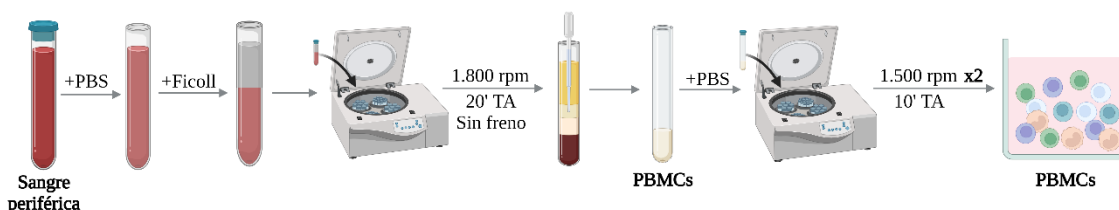


Figura 16. Representación esquemática de la purificación de PBMCs.

4.7. Ensayos funcionales

4.7.1. Ensayos funcionales de las vesículas extracelulares

4.7.1.1. Tinción de las vesículas extracelulares con PKH67

El marcaje fluorescente (verde) de las VEs purificadas a partir de plasma se llevó a cabo utilizando el agente intercalante de membrana PKH67 (Sigma). Para ello, los 100 μ l de la muestra resuspendida en PBS se incubaron durante 5 minutos a TA con 100 μ l de una solución de PKH67 a 4 μ M. Una vez transcurrido este tiempo, la reacción se bloqueó con 200 μ l de PBS con BSA al 5% durante 1 minuto a TA. A su vez, para eliminar el exceso de sonda se usó una *Exosome Spin Column* (Invitrogen). Esta columna se hidrató previamente con 600 μ l de PBS con EDTA a 5 mM (Sigma) durante 15 minutos a TA. Tras esto, se colocó en un Eppendorf de 2 ml y se centrifugó a 3.000 rpm durante 2 minutos a TA para eliminar el exceso de líquido. Una vez realizado este paso, la columna se pasó a un nuevo Eppendorf de 1,5 ml, se le añadieron las vesículas marcadas y se centrifugó a 3.000 rpm durante 2 minutos a TA. Las VEs teñidas quedaron en el eluido, el cual se conservó a 4°C hasta su uso (Figura 17).

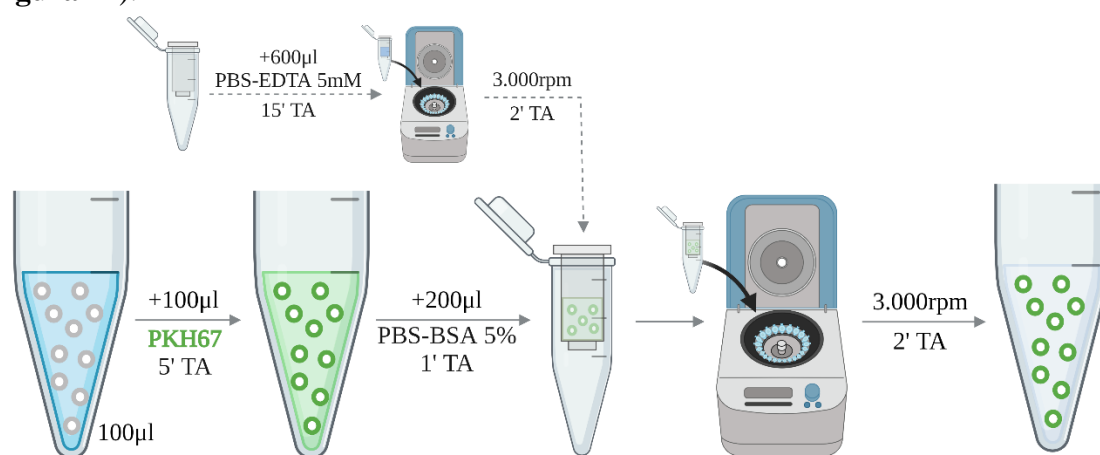


Figura 17. Resumen de los procedimientos para la tinción de las VEs.

4.7.1.2. Estudio de la interacción entre las células endoteliales y las vesículas extracelulares

La interacción entre las VEs y las CEs se evaluó *in vitro* mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Las HMVEC-L se sembraron en cámaras p8 (IBIDI) y se incubaron durante 5 horas con vesículas teñidas con PKH67 (verde). Una vez transcurrido este tiempo, las células se fijaron con PFA al 4% durante 15 minutos a TA, se lavaron 3 veces con una solución de PBS-Tween al 0,1% durante 5 minutos y se permeabilizaron con Tritón (Sigma) al 0,1% durante 5 minutos a 4°C. Tras esto, se realizaron 3 lavados y se bloquearon las uniones inespecíficas añadiendo una solución de PBS con BSA al 2% durante 20 minutos a TA. Posteriormente, los filamentos de actina se tiñeron de rojo incubando las células durante 30 minutos con el reactivo *Texas-Red-X phalloidin* (Invitrogen) a una concentración de 1:40 en una solución de PBS con BSA al 2%. Una vez finalizado este tiempo, se llevaron a cabo

3 lavados de 5 minutos con PBS y se hizo una segunda incubación de 10 minutos con una solución de DAPI (Sigma) a una concentración 1:1000 en H₂O milli-Q para teñir los núcleos de azul. Por último, se realizaron otros 3 lavados con PBS y se procedió al montaje de los cubreobjetos en los portaobjetos mediante el *FlourSave Reagent* (Calbiochem). Una vez finalizado, las preparaciones se almacenaron a 4°C hasta su visualización en el microscopio confocal invertido *LSM 700* (Carl Zeiss).

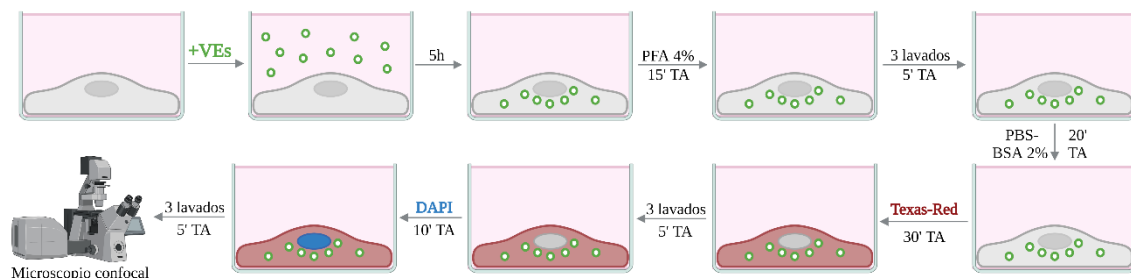


Figura 18. Descripción gráfica de los métodos utilizados para evaluar la interacción entre las VEs y las CEs.

4.7.1.3. Ensayo de permeabilidad endotelial en respuesta a las vesículas extracelulares

La formación de la monocapa endotelial se evaluó mediante la medida diaria de la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) por el dispositivo *EndOhm* (WW Instruments) en *Transwell* (TW) de 24 pocillos (Corning). Este sistema se encuentra constituido por una cámara y una caperuza que contienen un par de electrodos por los cuales fluye la corriente permitiendo determinar los valores de la resistencia en la monocapa de CEs.

Para llevar a cabo este ensayo se hidrataron los TW con FBS durante 1 hora, se sembraron 5×10^4 células de HMVEC-L y se mantuvieron ocho días en crecimiento en un medio libre de VEs. Este se preparó utilizando un FBS donde las vesículas se eliminaron mediante una ultracentrifugación de 24 horas a 100.000 g y 10°C. Tras unos días de siembra, la formación de la monocapa se determinó por la estabilización de los valores de la TEER. Una vez confirmado este punto, se disminuyó la concentración del FBS libre de vesículas en el medio hasta un 0,5% durante 18 horas (depleción). Posteriormente, se añadieron las VEs (100 µg/ml de proteína) purificadas a partir de plasma de la fase aguda y basal de pacientes adultos y se tomaron las medidas de TEER de la monocapa a diferentes tiempos (10, 60, 120 y 300 minutos). Además, como control negativo, los valores obtenidos se compararon con los de células estimuladas con medio EGM-2 + PBS (50/50%). Por otra parte, como controles del sistema, se utilizaron el AMP cíclico (AMPC) a 30 µM, la trombina a 0,5 µM y el PAF a 10 µM (todos Sigma). En concreto, el AMPC es un estabilizante de la monocapa mientras que la trombina y el PAF inducen su destabilización (**Figura 19**).

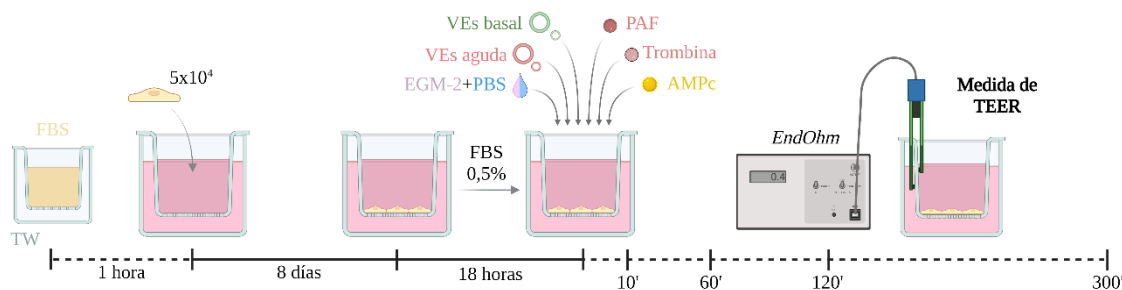


Figura 19. Representación esquemática del ensayo de permeabilidad endotelial en respuesta a las VEs.

4.7.1.4. Captación de las vesículas extracelulares por las células mononucleares de sangre periférica

La captación de las VEs por parte de las PBMCs se evaluó mediante citometría de flujo y microscopía confocal. Todo el protocolo se resume en la **Figura 20**. Para ello, las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se incubaron durante 4 horas con vesículas teñidas con el PKH67. A su vez, las PBMCs sin estimular se utilizaron como control. En todos los casos, se recogieron las células y se precipitaron a 1.500 rpm durante 10 minutos a TA. Consecutivamente, para lavarlas, se resuspendieron en 1 ml de PBS con FBS al 2% y se centrifugaron de nuevo a 1.500 rpm durante 10 minutos a TA. Tras esto, las células se marcaron durante 20 minutos a 4°C para su estudio por citometría de flujo. Este proceso se llevó a cabo con 200 µl de una solución de PBS con FBS al 2% y anticuerpos primarios (1:40) específicos de ratón frente a humano (todos BD Biosciences). En concreto, anti-CD3 (APC) y anti-CD4 (PE-Cy7) se utilizaron para identificar a los linfocitos Th, anti-CD14 (PE) a los monocitos y anti-CD19 (BV421) a los linfocitos B. Transcurrido este tiempo, las PBMCs marcadas se precipitaron a 1.500 rpm durante 10 minutos a TA y se lavaron de nuevo con 1 ml de PBS con FBS al 2%. Por último, se resuspendieron en 400 µl de PBS con FBS al 2% y se separaron utilizando un citómetro de flujo (FACS) de 5 láseres y 17 colores *FACSAria III* (BD Biosciences). A su vez, los datos obtenidos se analizaron usando el programa *BD FACS Diva Software v. 9.01*.

Una vez separadas las diferentes poblaciones, las células se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos a TA, se resuspendieron en 400 µl de PBS con PFA al 4% y se fijaron durante 10 minutos a TA. Tras esto, se precipitaron sobre un portaobjetos a 1.000 rpm durante 10 minutos a TA mediante un *Thermo Shandon Cytospin 3* (Thermo Scientific). Consecutivamente, los cristales se lavaron 10 minutos con PBS y se tiñeron los núcleos de las células durante 5 minutos con una solución de los colorantes correspondientes diluidos 1:5.000 en PBS. En concreto, para los linfocitos B se utilizó el DRAQ5 (BioStatus), mientras que para los linfocitos Th y los monocitos se usó el Hoechst (Invitrogen). Por último, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se montaron los cubreobjetos sobre los portaobjetos con una solución de PBS con glicerol al 60%. Estas preparaciones se almacenaron a 4°C hasta su visualización en el microscopio confocal *FV3000* (Olimpus). Además, el procesamiento de las imágenes obtenidas se llevó a cabo mediante el programa *FV31-SW*.

Por otra parte, para comparar la captación de las VEs entre las diferentes poblaciones de PBMCs, las células marcadas y resuspendidas en 400 µl de PBS con FBS al 2% se analizaron mediante el citómetro de flujo de 5 láseres y 18 colores *CSR Fortessa X-20* (BD Biosciences). A su vez, la captación de las VEs se determinó en función de los niveles de PKH67 (FITC) en cada una de las poblaciones.

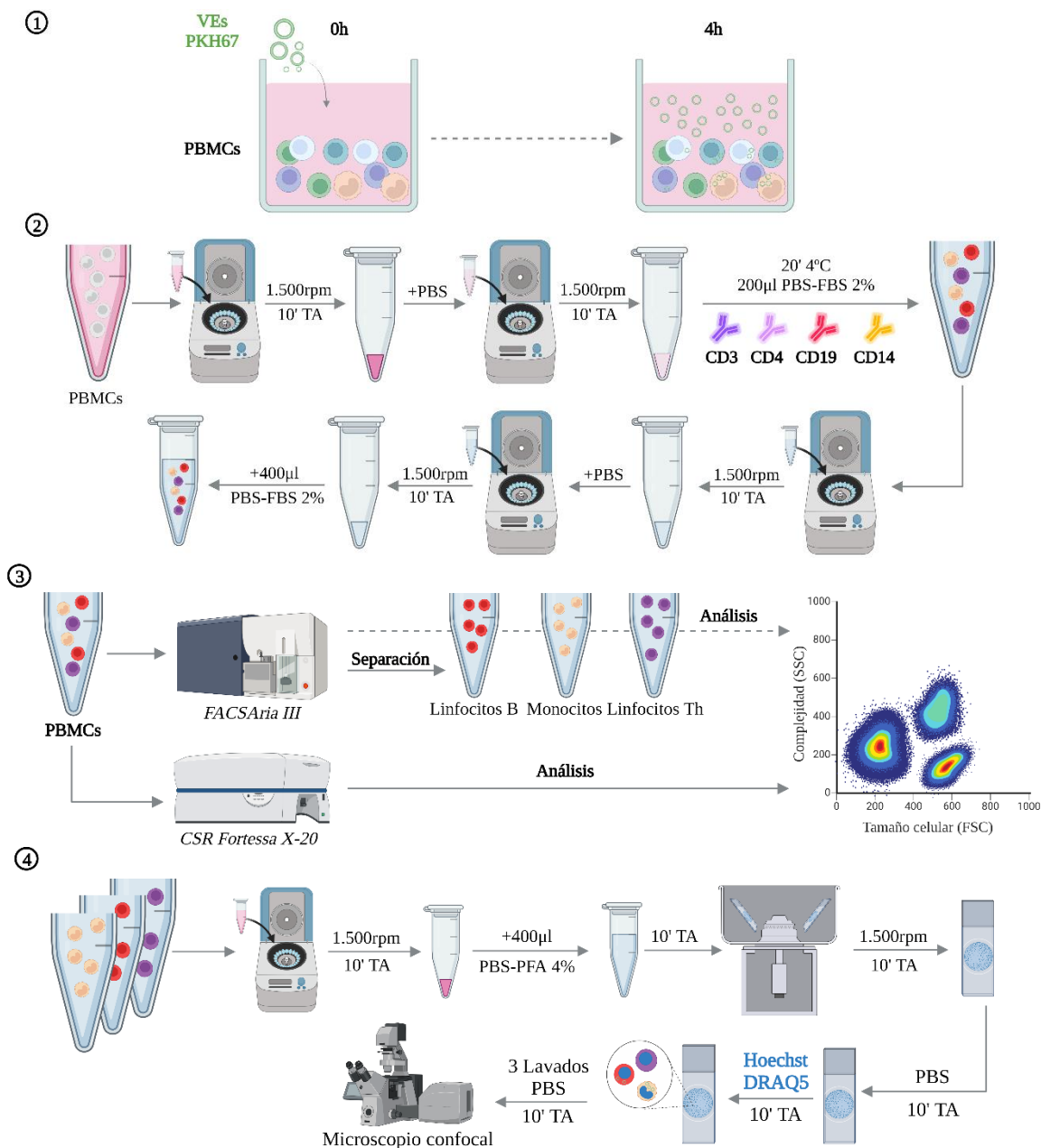


Figura 20. Resumen de los ensayos utilizados para el estudio de la captación de VEs por las PBMCS. (1) Incubación de las PBMCS con las VEs teñidas con PKH67. (2) Marcaje de las células con anticuerpos primarios específicos. (3) Separación y análisis de las poblaciones mediante citometría de flujo. (4) Inmunofluorescencia y visualización de las células por microscopía confocal.

4.7.2. Ensayos funcionales de microARNs en células endoteliales

4.7.2.1. Evaluación de los niveles de miR-21-3p y miR-487b-3p en respuesta a estímulos de anafilaxia

Para determinar la posible contribución de las CE a la liberación de miARNs durante la anafilaxia se utilizaron las HMVEC-D. Estas células, se incubaron durante 2 horas en diferentes condiciones: con el medio EGM-2 (control negativo), con un cóctel de mediadores de anafilaxia (control positivo) y con 400 μ l de suero de la fase aguda y basal de niños con anafilaxia por alimentos. En concreto, los mediadores utilizados en el cóctel fueron la histamina 1 μ M, el PAF 10 μ M y la trombina 0,5 μ M (todos Sigma).

La evaluación de los niveles del miR-21-3p y del miR-487b-3 se llevó a cabo a partir de 200 μ l de suero de la fase aguda y de la fase basal tanto en el momento inicial como a las 2 horas

tras el contacto con las CE. Por otra parte, los niveles intracelulares se determinaron al final del ensayo (2 horas). El protocolo se detalla en la **Figura 21**.

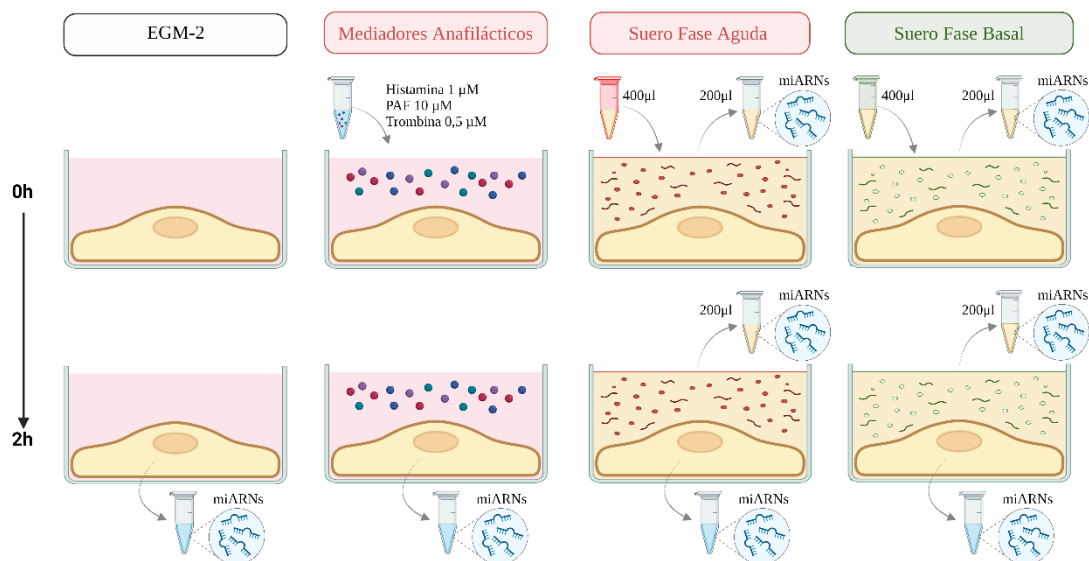


Figura 21. Esquema de los procedimientos realizados para determinar la contribución de las CE a los niveles de miARNs durante la anafilaxia.

4.7.2.2. Transfección del miR-375-3p en células endoteliales

El efecto funcional del miR-375-3p se evaluó transfectando las HMVEC-D. Para ello, se utilizó medio Opti-MEM (Thermo Scientific), el reactivo de transfección *TransIT-X2 Dynamic Delivery System* (Qiagen), miARNs controles fluorescentes del mímico y del inhibidor que no reconocen ningún ARNm (*scramble*) y un mímico e inhibidor del miR-375-3p.

En primer lugar, se sembraron las células y se dejaron crecer durante 24 horas para que alcanzaran una confluencia del 70-80%. Al día siguiente, se prepararon las mezclas del reactivo de transfección con los miARN (50 mM) en medio Opti-MEM y se esperó 30 minutos a que se formaran los complejos de transfección. Tras esto, se añadieron a las CE y se dejaron incubando durante 72 horas. Una vez pasado este tiempo, se llevaron a cabo los estudios moleculares y funcionales de las células transfectadas (**Figura 22**).

El correcto desarrollo de la transfección se confirmó mediante qPCR y microscopía confocal. En el primer caso, se extrajeron los miARNs intracelulares y se midieron los niveles del miR-375-3p. En el segundo, las células se fijaron y tiñeron de igual manera a lo descrito previamente para las VEs. La transfección se confirmó mediante la visualización del *scramble* fluorescente (verde) en el interior de las CE.

A su vez, para evaluar la viabilidad de las células incubadas con el inhibidor del miR-375-3p, se llevó a cabo la transfección de las HMVEC-D con concentraciones decrecientes de esta molécula (50, 25, 10, 5, 1, 0,5, 0,1 mM) y se valoró el estado de la monocapa endotelial por medio de imágenes de inmunofluorescencia.

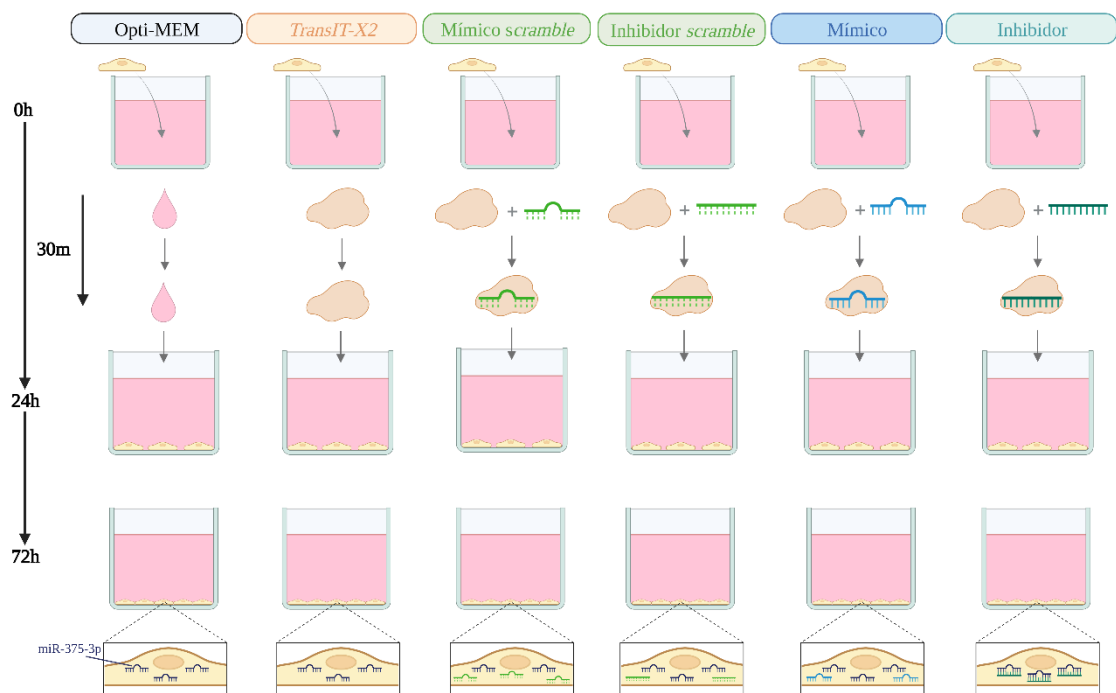


Figura 22. Descripción gráfica del protocolo de transfección.

4.7.2.3. Ensayo de permeabilidad endotelial en células transfectadas con el miR-375-3p

Para determinar el efecto del miR-375-3p en la señalización del AMPc, las HMVEC-D se transfectaron sobre los TW. A su vez, la permeabilidad endotelial se evaluó midiendo los cambios de la TEER a diferentes tiempos (10, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 minutos), al igual que en el caso de las VEs. En cada medida, como control negativo, se registraron los valores de resistencia de las CE basales (solo medio de cultivo), de las incubadas con el reactivo de transfección y de las transfectadas con los *scramble* fluorescentes. Además, el efecto del miR-375-3p se determinó en células transfectadas con su mímico y su inhibidor. Todas las condiciones se incubaron con medio EGM-2, como control, y con AMPc (Figura 23).

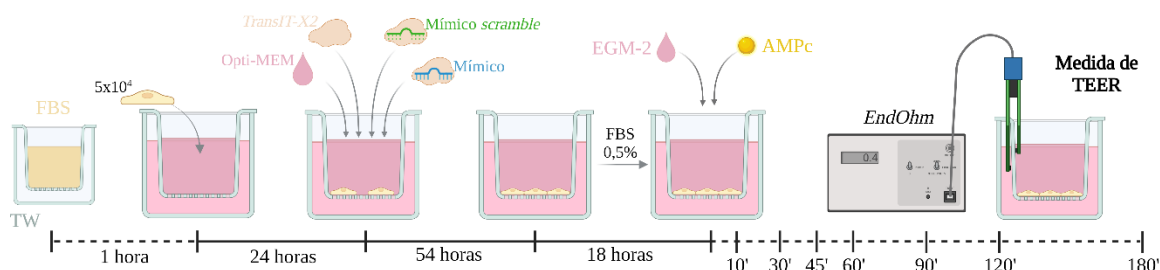


Figura 23. Resumen del ensayo de permeabilidad endotelial en células transfectadas con el miR-375-3p.

4.8. Análisis estadísticos

El análisis de los datos y su representación gráfica se realizaron con los programas *Graph Pad Prism 8* y/o *R 3.5.3*. Además, el umbral de significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

En todos los casos, las variables cualitativas se describieron como la frecuencia y el porcentaje. Sin embargo, en las variables cuantitativas siempre se evaluó primero la distribución de los datos mediante pruebas de normalidad. Una vez determinado este aspecto, cuando los valores presentaban una distribución normal se utilizaron análisis paramétricos y se representaron con la media y el error estándar de la media (SEM). Por otra

parte, cuando los datos no cumplían con la normalidad se usaron pruebas no paramétricas y se ilustraron con la mediana y el rango intercuartílico (RIQ).

4.8.1. Análisis de las proteínas séricas circulantes

Todos los datos de las proteínas séricas circulantes siguieron una distribución no normal por lo que los análisis se realizaron con pruebas no paramétricas. Para determinar las diferencias significativas entre los valores obtenidos en la fase aguda y la basal de cada grupo se utilizó la prueba pareada de los rangos con signo de Wilcoxon. Sin embargo, para la comparación entre grupos, se utilizaron pruebas no pareadas y los datos se normalizaron en cada paciente atribuyendo el valor de 1 a la fase basal y el aumento o descenso proporcional a la condición aguda (ratio aguda/basal). Para evaluar las diferencias significativas entre los pacientes con anafilaxia y aquellos con reacciones de Grado 1 se aplicó la prueba U de Mann-Whitney. Sin embargo, cuando se analizaron tres o más grupos, se utilizó la prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis con test de Dunn. Además, para establecer la relación lineal entre las diferentes variables se realizó la prueba de correlación de Spearman.

4.8.2. Análisis de las vesículas extracelulares

El análisis de los datos obtenidos por espectrometría de masas se llevó a cabo en el servicio de proteómica de la UCM. Las proteínas se consideraron estadísticamente diferenciales con un p valor $<0,01$. Para ello, los datos de los espectros se importaron al programa *R* donde se realizó un análisis estadístico con pruebas binomiales pareadas de acuerdo con lo descrito por Pham *et al.*¹⁹³. A su vez, el gráfico de volcán se realizó con el programa *Graph Pad Prism 8*.

Para estudiar los valores obtenidos durante la caracterización de las VEs de plasma de adultos con anafilaxia se usaron pruebas paramétricas y no paramétricas en función de la distribución de los datos. En concreto, para el tamaño de las vesículas se usó la prueba de t de Student pareada, mientras que para la concentración se utilizó la prueba pareada de los rangos con signo de Wilcoxon. A su vez, para la caracterización de las VEs de suero en niños con anafilaxia por alimentos se aplicaron solo pruebas paramétricas y ambas comparaciones se llevaron a cabo con la prueba de t de Student pareada. Sin embargo, cuando se incluyeron las vesículas purificadas a partir de suero de pacientes adultos se utilizaron pruebas no paramétricas y tanto el tamaño como la concentración se analizaron con la prueba pareada de los rangos con signo de Wilcoxon.

Por otra parte, para la validación de los resultados de proteómica, los niveles de las proteínas en las VEs se normalizaron en cada paciente atribuyendo el valor de 1 a la fase basal y el aumento o descenso proporcional a la condición aguda (ratio aguda/basal). Tras esto, las comparaciones entre ambas fases se llevaron a cabo con la prueba pareada de los rangos con signo de Wilcoxon.

A su vez, los análisis de los ensayos funcionales de las VEs se realizaron con pruebas paramétricas y no paramétricas. En concreto, cuando se contrastaron más de 2 variables en el ensayo de permeabilidad se utilizó el análisis de varianzas (ANOVA) con test de Bonferroni. Sin embargo, para las comparaciones entre la fase aguda y basal se usó la prueba de t de Student pareada. Por otra parte, para evaluar la captación de las VEs por los monocitos se utilizó la prueba pareada de los rangos con signo de Wilcoxon, mientras que para los linfocitos B se aplicó la prueba de t de Student pareada.

4.8.3. Análisis de los microARNs

Los datos obtenidos mediante NGS se analizaron en el servicio de proteómica de la UCM por medio del programa *R 3.5.3*. La normalización y la cuantificación relativa de estos valores se realizó con el paquete *Prostar* (<http://live.prostar-proteomics.org/>) distribuido por *Bioconductor* e implementado en *R*. Sin embargo, el gráfico de volcán se realizó con el programa *Graph Pad Prism 8*.

Los datos de abundancia del NGS fueron transformados (\log_2) en el software *R 3.5.3* para obtener una distribución simétrica antes del análisis estadístico. Además, todos aquellos miARNs que no fueron detectados en al menos dos muestras por condición fueron descartados. Por otra parte, las matrices se normalizaron con el método *Cyclic Loess* debido a que disminuye las varianzas sistémicas y aumenta la eficiencia en la detección de cambios en los niveles de miARNs¹⁹⁴. Tras esto, se utilizó la prueba pareada de t de Student para determinar los niveles significativamente diferenciales entre ambas condiciones, ya que clasifica las moléculas en base a su expresión minimizando los sesgos en los datos¹⁹⁵. No obstante, a causa de las variaciones entre los pacientes y a la no detección en parte de las muestras, pocos miARNs fueron detectados con FDR, por lo que no se tuvo en cuenta este criterio estadístico a la hora de seleccionar las dianas de validación.

Para la validación de los miARNs por qPCR, y su estudio en las VEs, los niveles de cada paciente se normalizaron atribuyendo el valor de 1 a la fase basal y el aumento o descenso proporcional a la condición aguda (ratio aguda/basal). Además, en aquellos sujetos con datos faltantes en alguna de sus condiciones por no encontrarse dentro del rango de sensibilidad del dispositivo, los valores fueron imputados, según fuera preciso, con la ratio máxima o mínima detectada. Asimismo, las comparaciones entre ambas fases se llevaron a cabo en todos los casos con la prueba pareada de los rangos con signo de Wilcoxon.

Sin embargo, para el estudio de los datos obtenidos en los ensayos funcionales se usaron pruebas tanto paramétricas como no paramétricas en función de la distribución de los datos. Concretamente, en el caso del miR-21-3p y del miR-487b-3p, los cambios en los niveles séricos antes y después del contacto con las CEs se analizaron con la prueba pareada de los rangos con signo de Wilcoxon. Sin embargo, para la comparación entre los niveles intracelulares se usó la prueba de t de Student. Por otra parte, para el análisis del miR-375-3p se utilizaron solo pruebas paramétricas y todos los estudios se llevaron a cabo con la prueba de t de Student.

5. RESULTADOS



5.1. Proteínas séricas circulantes en anafilaxia: diagnóstico personalizado y cuantificación indirecta de la extravasación en humanos

5.1.1. Características de los pacientes y de sus reacciones de hipersensibilidad

Con motivo de estudiar las proteínas séricas circulantes en anafilaxia se utilizaron muestras de 150 pacientes con reacciones de hipersensibilidad (**Tabla 4**). Esta población oscilaba entre los 5 y 81 años y más de la mitad eran mujeres. En cuanto a las reacciones, tres de cada cuatro se clasificaron como anafilaxia (eventos de Grado 2 y Grado 3) y los desencadenantes más comunes fueron los medicamentos. Precisamente, todos los casos de Grado 1 fueron causados por estos alérgenos y solo mostraron alteraciones en la piel y las mucosas. Sin embargo, en los pacientes con anafilaxia, los síntomas más frecuentes fueron los cutáneos y respiratorios, seguidos de los de las mucosas, de los digestivos, de los cardiovasculares y, por último, de los nerviosos. No obstante, en las reacciones de Grado 3 las manifestaciones más comunes fueron las cardiovasculares y las cutáneas.

	Total	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Anafilaxia†	P valor‡
Número	150	38	83	29	112	-
Género (mujeres)	61%	68%	59%	58%	62%	0,3394
Edad (años) ± SEM	39,5 ± 1,5	46,0 ± 3	34,4 ± 1,9	42,8 ± 3,5	37,3 ± 1,7	*0,0382
Atopia	49%	29%	58%	48%	55%	*0,0083
Alergias basales	46%	29%	58%	48%	55%	*0,0083
<i>Asma</i>	27%	13%	35%	21%	31%	*0,0339
<i>Rinitis</i>	37%	21%	47%	31%	43%	*0,0197
<i>Dermatitis atópica</i>	6%	0%	6%	14%	8%	0,1157
Desencadenante						
Medicamentos	66%	100%	52%	62%	55%	*<0,0001
<i>AINES</i>	45%	50%	47%	28%	41%	0,3504
<i>Antibióticos</i>	37%	42%	34%	33%	34%	0,4348
<i>Contraste</i>	5%	3%	5%	11%	7%	0,4496
<i>Quimioterapia</i>	7%	0%	7%	22%	11%	*0,0374
<i>Otros∴</i>	6%	5%	7%	6%	7%	0,7387
Alimentos	29%	0%	40%	35%	38%	*<0,0001
<i>Frutos secos</i>	23%	0%	21%	30%	23%	*0,0008
<i>Pescado/Marisco</i>	23%	0%	25%	20%	23%	*0,0008
<i>Fruta</i>	14%	0%	15%	10%	14%	*0,0122
<i>Leche</i>	19%	0%	21%	10%	19%	*0,0013
<i>Huevo</i>	14%	0%	12%	20%	14%	*0,0122
<i>Otros∴∴</i>	7%	0%	6%	10%	7%	0,1921
<i>Otros‡</i>	5%	0%	8%	3%	7%	0,1921
Síntomas						
<i>Piel</i>	89%	92%	87%	90%	88%	0,5698
<i>Mucosa</i>	49%	42%	53%	45%	51%	0,4528
<i>Digestivo</i>	37%	0%	49%	52%	50%	*<0,0001
<i>Respiratorio</i>	64%	0%	88%	79%	86%	*<0,0001
<i>Neurológico</i>	19%	0%	19%	41%	25%	*0,0004
<i>Cardiovascular</i>	23%	0%	11%	86%	30%	*<0,0001
Tratamiento§	62%	24%	75%	73%	79%	*<0,0001
<i>Adrenalina</i>	61%	11%	61%	83%	67%	*<0,0001
<i>Antagonista de H1R</i>	81%	100%	79%	78%	79%	*0,0013
<i>Antagonista de H2R</i>	18%	11%	11%	39%	19%	0,3173
<i>Corticoesteroides</i>	80%	100%	75%	83%	77%	*0,0008
<i>Agonista de β2A</i>	17%	0%	20%	17%	19%	*0,0051

Tabla 4. Características de los pacientes y de sus reacciones de hipersensibilidad. † Pacientes con reacciones de Grado 2 y Grado 3. ‡ Diferencias estadísticas entre los pacientes con reacciones de Grado 1 y aquellos con anafilaxia (*: p valor <0,05). ∴ Anafilaxias inducidas por analgésico, anestésicos, inhibidores de la bomba de protones (IBP) o inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECAS). ∴∴ Anafilaxias por mostaza o miel. ‡ Anafilaxias idiopáticas, por picadura de insectos o por vacunas. § Porcentaje de pacientes tratados antes de la obtención de la muestra aguda. En el resto de los sujetos se administró la medicación después de recoger la muestra aguda. AINES: antiinflamatorios no esteroideos, H1R: receptor 1 de la histamina, H2R: receptor 2 de la histamina, β2A: receptores adrenérgicos β2.

Por otra parte, en más de la mitad de los pacientes se administró el tratamiento antes de la obtención de la muestra aguda, ya que siempre se priorizó la salud de los individuos. En estos casos, los antihistamínicos y los corticoesteroides fueron los fármacos más utilizados, seguidos de la adrenalina y de los agonistas de los receptores adrenérgicos β_2 .

5.1.2. La relación entre los niveles agudos y basales de triptasa sérica presenta una mejor capacidad diagnóstica de la anafilaxia

En primer lugar, se determinaron los niveles de la triptasa sérica, el principal biomarcador de anafilaxia utilizado en la práctica clínica. Los resultados obtenidos revelaron que la concentración de esta proteína aumentaba significativamente en los pacientes con anafilaxia (casos de Grado 2 y Grado 3) durante la fase aguda en comparación con la basal (**Figura 24A**). Sin embargo, no se elevaba en aquellos con reacciones de Grado 1 (**Figura 24B**). Además, al comparar la relación entre la fase aguda y basal de los niveles de triptasa (ratio agudo/basal) se observó un incremento significativo, y de más del doble, en los pacientes con anafilaxia respecto a los de Grado 1 (**Figura 24C**). A su vez, estas ratios aumentaban de manera acorde a la gravedad de la reacción, elevándose un 60% en los casos de Grado 2 y un 240% en los de Grado 3 (**Figura 24D**).

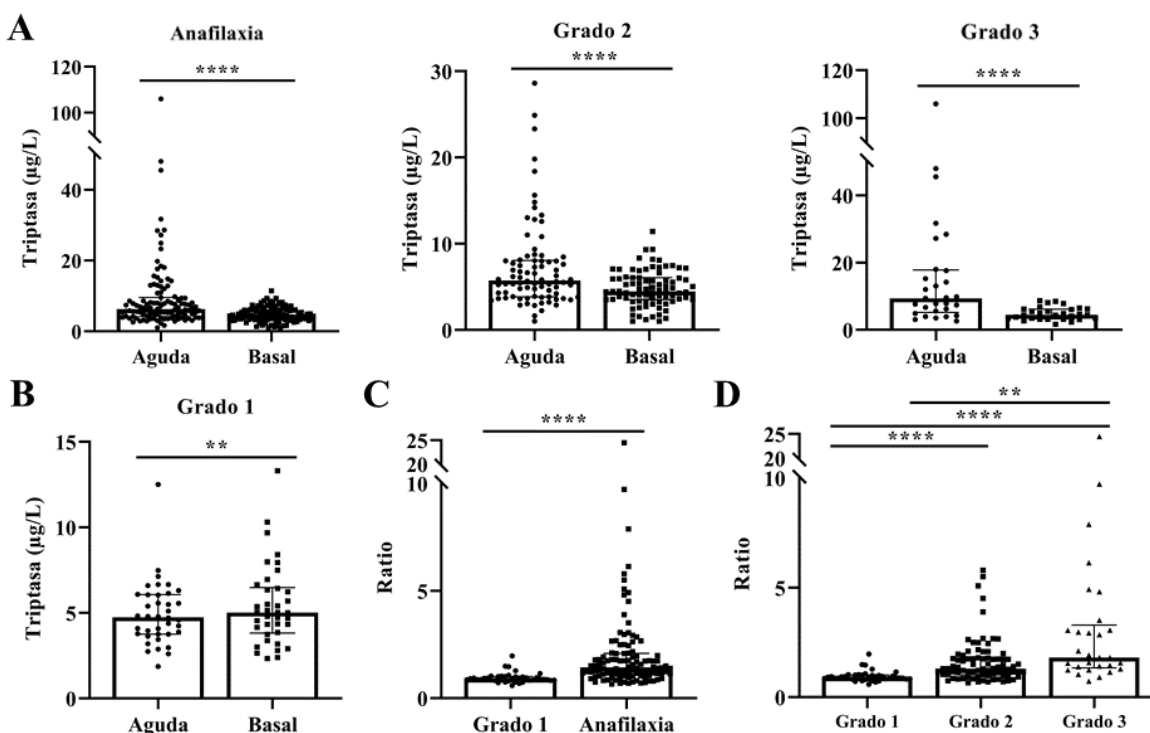


Figura 24. Los niveles de triptasa sérica aumentan durante la anafilaxia acorde a la gravedad de la reacción. (A) Comparación de las concentraciones de triptasa sérica en los pacientes con anafilaxia y estratificando entre aquellos con reacciones de Grado 2 y Grado 3 (****p: <0,0001). (B) Medidas de triptasa sérica en los individuos con reacciones de Grado 1 (**p: 0,0029). (C) Comparación de la ratio (agudo/basal) entre los pacientes con reacciones de Grado 1 y aquellos con anafilaxia (****p: <0,0001). (D) Diferencias en las ratios de triptasa sérica en función de la gravedad de la reacción (**p: 0,0091, ****p: <0,0001).

Por otra parte, se evaluó la capacidad diagnóstica de la triptasa sérica en cada uno de los umbrales propuestos en la bibliografía. En concreto, se comparó el aumento del valor agudo ($\geq 11,4 \mu\text{g/L}$) respecto a las aproximaciones que tenían en cuenta los niveles basales (20% + $2 \mu\text{g/L}$ y 135%). Los resultados obtenidos demostraron una mayor sensibilidad y una mejor correlación con los síntomas clínicos de la anafilaxia cuando se consideraba el estado basal

RESULTADOS

de los individuos. Precisamente, más del doble de los pacientes fueron clasificados correctamente utilizando el incremento del 135% en la fase aguda (**Tabla 5**).

	11,4 µg/L	20% + 2 µg/L ⁴⁷	135% ⁴⁸
Grado 1	3%	0%	8%
Grado 2	14%	27%	47%
Grado 3	41%	52%	76%
Anafilaxia	21%	34%	55%
Sensibilidad	21%	34%	55%
Especificidad	97%	100%	92%

Tabla 5. La medicina personalizada de los pacientes con anafilaxia mejora la capacidad diagnóstica de la triptasa sérica. Porcentaje de pacientes considerados positivos en cada grupo según los diferentes umbrales de referencia propuestos para la triptasa sérica. Aumento de su valor agudo (11,4 µg/L) o en comparación con su estado basal (20% + 2 µg/L o 135%). La sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la anafilaxia se indican en cada punto de corte.

5.1.3. La concentración de proteínas séricas disminuye durante la anafilaxia

El aumento de la permeabilidad vascular es una de las principales alteraciones fisiopatológicas acontecidas en la anafilaxia. Este proceso se rige por el principio de Starling y provoca modificaciones en los niveles de varias proteínas circulantes. Por lo tanto, medir el cambio en la concentración de proteínas séricas durante la fase aguda permitiría cuantificar indirectamente la extravasación subyacente a la reacción anafiláctica.

Precisamente, el análisis realizado en los individuos de Grado 1 no reveló ningún cambio en la concentración de proteínas séricas entre ambas fases (**Figura 25A**). Sin embargo, en los pacientes con anafilaxia, se observó un descenso significativo de este parámetro durante la fase aguda respecto a la basal (**Figura 25B-C**). Además, la comparación de las ratios (agudo/basal) de la concentración de proteínas séricas mostró que los valores obtenidos en los individuos con anafilaxia disminuían un 6% frente aquellos de Grado 1 (**Figura 25D**). Asimismo, este descenso ocurría de manera acorde a la gravedad de la reacción, siendo del 4% en los casos de Grado 2, del 11% en los de Grado 3 y no modificándose en los de Grado 1 (**Figura 25E**). No obstante, no se vio ninguna correlación entre la disminución de este parámetro y el aumento de los niveles de triptasa sérica ($R: -0,1638$; $p: 0,0872$).

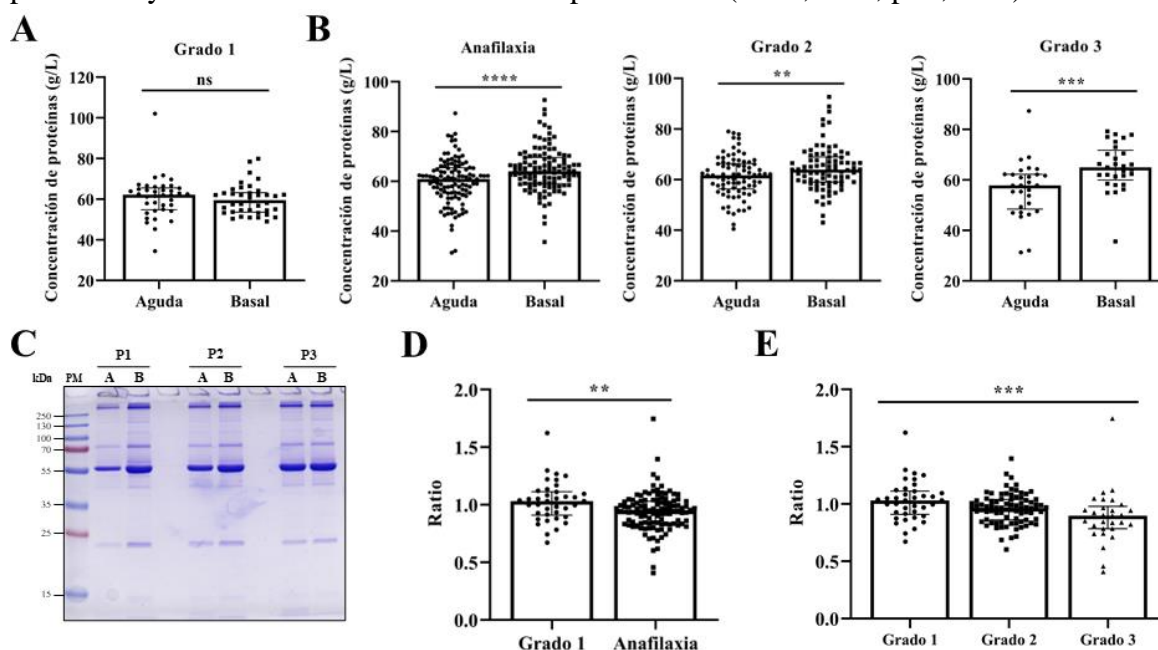
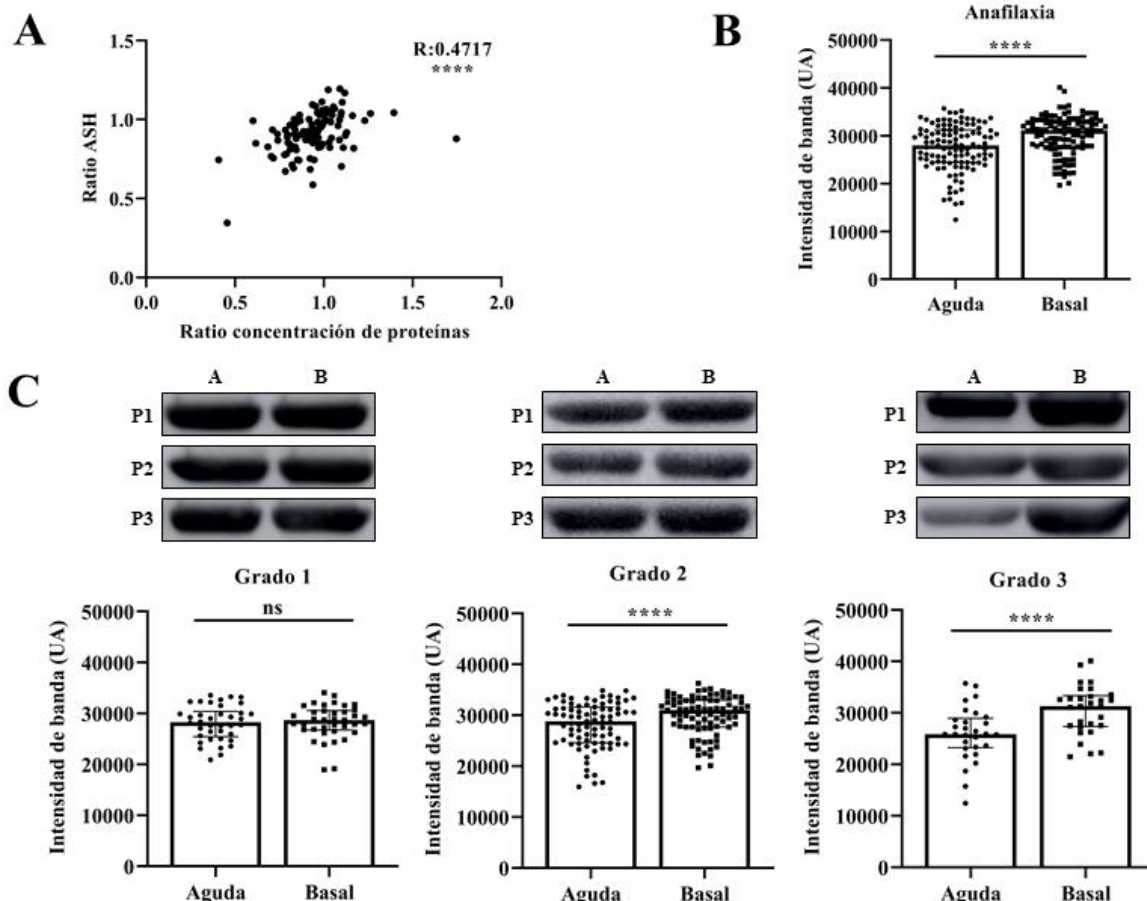


Figura 25. La concentración de proteínas séricas desciende durante la anafilaxia acorde a la gravedad de la reacción. (A) Determinación de la concentración de proteínas séricas en los individuos con reacciones de Grado 1. ns: no significativo. (B) Medidas de la concentración de proteínas séricas en el total de pacientes con anafilaxia (****p: <0,0001), así como estratificando entre aquellos de Grado 2 (**p: 0,0015) y Grado 3 (***p: 0,0005). (C) Perfil de proteínas séricas de las fases agudas (A) y basales (B) de tres pacientes representativos con anafilaxia (P1, P2 y P3). kDa: kilodalton, PM: peso molecular. (D) Comparación de las ratios (agudo/basal) de la concentración de proteínas séricas entre los individuos con reacciones de Grado 1 y los pacientes con anafilaxia (**p: 0,0044). (E) Diferencias en las ratios de la concentración de proteínas séricas en función de la gravedad de la reacción (**p: 0,0009).

5.1.4. Los niveles de albúmina sérica humana descienden durante la anafilaxia

A causa del descenso de la concentración de proteínas séricas, se midieron los valores de la ASH, ya que ésta supone más del 50% del total de las proteínas presentes en el suero¹¹⁴. Precisamente, los niveles de la ASH disminuyeron significativamente durante la fase aguda en los pacientes con anafilaxia y se correlacionaron con la reducción de la concentración de proteínas séricas observada previamente (**Figura 26A-B**). Sin embargo, no se encontró ninguna relación con el aumento de la triptasa (R: -0,09407; p: 0,3283). Asimismo, se midieron los valores de la ASH en función de la gravedad de la reacción, caracterizándose un descenso significativo durante la fase aguda en los casos de Grado 2 y de Grado 3, pero no en los de Grado 1 (**Figura 26C**). A su vez, como ocurría con la concentración de proteínas séricas, las ratios (agudo/basal) de la ASH fueron un 8% menores en los pacientes con anafilaxia que en los de Grado 1 (**Figura 26D**). En concreto, este descenso ocurría de manera acorde a la gravedad de la reacción, no modificándose en los casos de Grado 1 y reduciéndose un 6% y 15% en aquellos de Grado 2 y Grado 3 (**Figura 26E**).



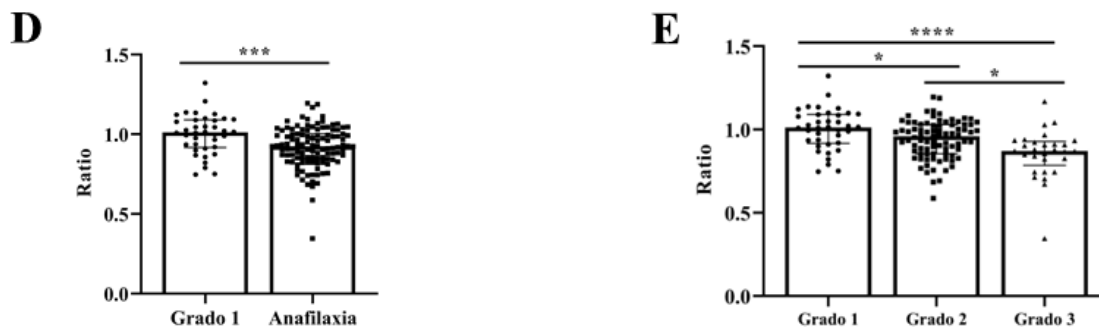


Figura 26. Los niveles de la ASH descienden durante la anafilaxia acorde a la gravedad de la reacción. (A) Comparación de los valores de ASH entre la fase aguda y basal de los pacientes con anafilaxia (****p: <0,0001). UA: unidades arbitrarias. (B) Correlación entre la ratio (agudo/basal) de la ASH y de la concentración de proteínas séricas (****p: <0,0001). (C) En los paneles superiores se muestran los Western blot de la ASH en las fases agudas (A) y basales (B) de tres pacientes representativos (P1, P2 y P3) de cada grupo (Grado 1, Grado 2 y Grado 3). En los inferiores se observan los gráficos de la cuantificación de sus valores en los pacientes de Grado 1, Grado 2 (****p: <0,0001) y Grado 3 (****p: <0,0001). ns: no significativo. (D) Comparación de las ratios de la ASH entre los pacientes con anafilaxia y aquellos con reacciones de Grado 1 (****p: 0,0005). (E) Estratificación de las ratios de la ASH en función de la gravedad de la reacción. Grado 1 vs. Grado 2 (*p: 0,0416), Grado 1 vs. Grado 3 (****p: <0,0001), Grado 2 vs. Grado 3 (*p: 0,0106).

Por otra parte, dado que las reacciones de anafilaxia incluyen una gran variedad de signos y síntomas, se compararon las ratios de la ASH en función de los órganos y/o sistemas afectados. En el caso de las reacciones de Grado 1, las cuales incluían manifestaciones de la piel y de las mucosas, no se observó ningún cambio. Sin embargo, en los pacientes de Grado 2 se vio una disminución del 6%, 7% y 10% de la ASH en aquellos con síntomas respiratorios, digestivos o neurológicos, respectivamente. Por último, las reacciones de Grado 3 mostraron el mayor descenso de esta proteína, siendo del 11% en los pacientes con problemas respiratorios y del 17% en aquellos con alteraciones cardiovasculares (**Figura 27**).

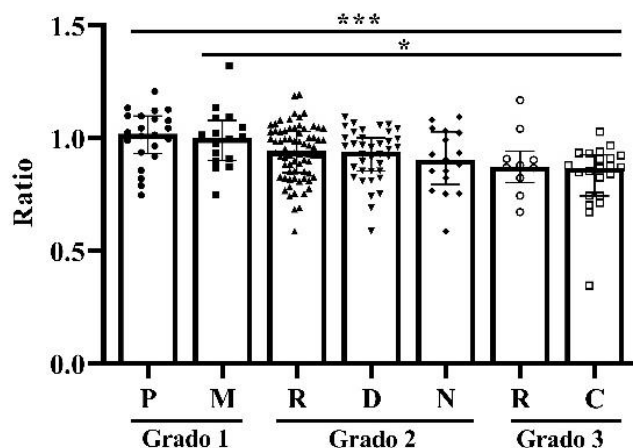


Figura 27. Ratio (agudo/basal) de la ASH en las reacciones de Grado 1, Grado 2 y Grado 3 en función de los órganos/sistemas afectados. Grado 1P vs. Grado 3C (****p: 0,0003), Grado 1M vs. Grado 3C (*p: 0,011). Grado 1P (N: 22), Grado 1M (N: 16), Grado 2R (N: 72), Grado 2D (N: 40), Grado: 2N (N: 17), Grado 3R (N: 10), Grado 3V (N: 22). P: piel, M: mucosa, R: respiratorio, D: digestivo, N: neurológico, C: cardiovascular.

5.1.5. La subunidad β de la hemoglobina aumenta en la fase aguda de los pacientes con reacciones de hipersensibilidad

La visualización del perfil de proteínas séricas mediante SDS-PAGE reveló el aumento de una proteína de 14 kDa durante la fase aguda (**Figura 28A**). Esta banda fue caracterizada y se identificó como la HBB (**Figura 28B**). Curiosamente, esta proteína forma parte de la hemoglobina, cuyas medidas fueron utilizadas por Fisher en 1986 para cuantificar, por primera vez, la extravasación subyacente a la anafilaxia en humanos⁹⁸.

RESULTADOS

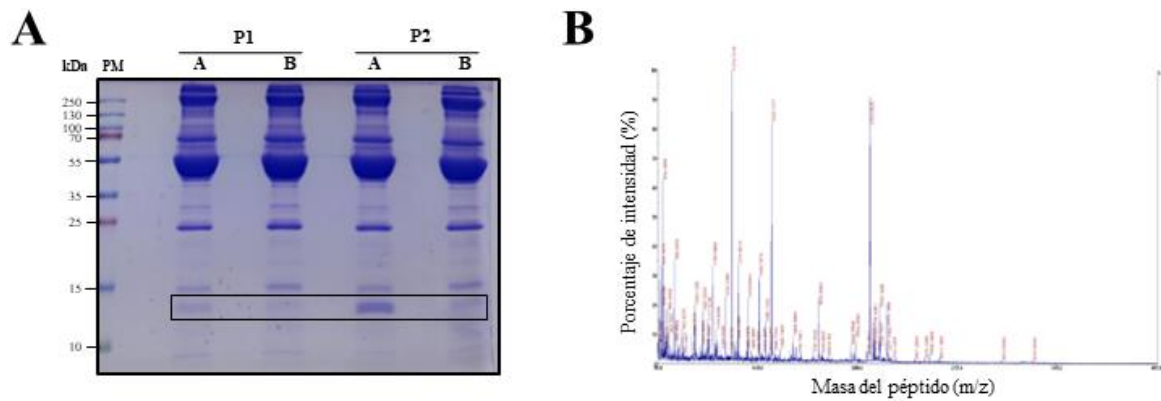


Figura 28. Identificación y caracterización de la HBB. (A) Perfil de proteínas séricas de las fases agudas (A) y basales (B) de dos pacientes representativos con anafilaxia (P1 y P2). El rectángulo indica la proteína HBB. kDa: kilodalton, PM: peso molecular. (B) Espectro peptídico obtenido por espectrometría de masas. El eje X representa la masa del péptido (m/z), mientras que el eje Y muestra el porcentaje de intensidad (%).

El análisis llevado a cabo en los individuos con reacciones de Grado 1 reveló un aumento de la HBB durante la fase aguda (**Figura 29A**). A su vez, esta elevación también se observó en el total de los pacientes con anafilaxia, así como al evaluar de manera independiente los de Grado 2 y Grado 3 (**Figura 29B-C**). Sin embargo, no se encontraron diferencias ni al comparar las ratios (aguda/basal) de la HBB entre los casos de Grado 1 y de anafilaxia, ni al estratificar en función de la gravedad de la reacción (**Figura 29D-E**). Además, tampoco se vio ninguna correlación con la triptasa sérica (R: 0,1308; p: 0,1308), con la concentración de proteínas (R: -0,0005; p: 0,9948) o con la ASH (R: -0,1409; p: 0,0855).

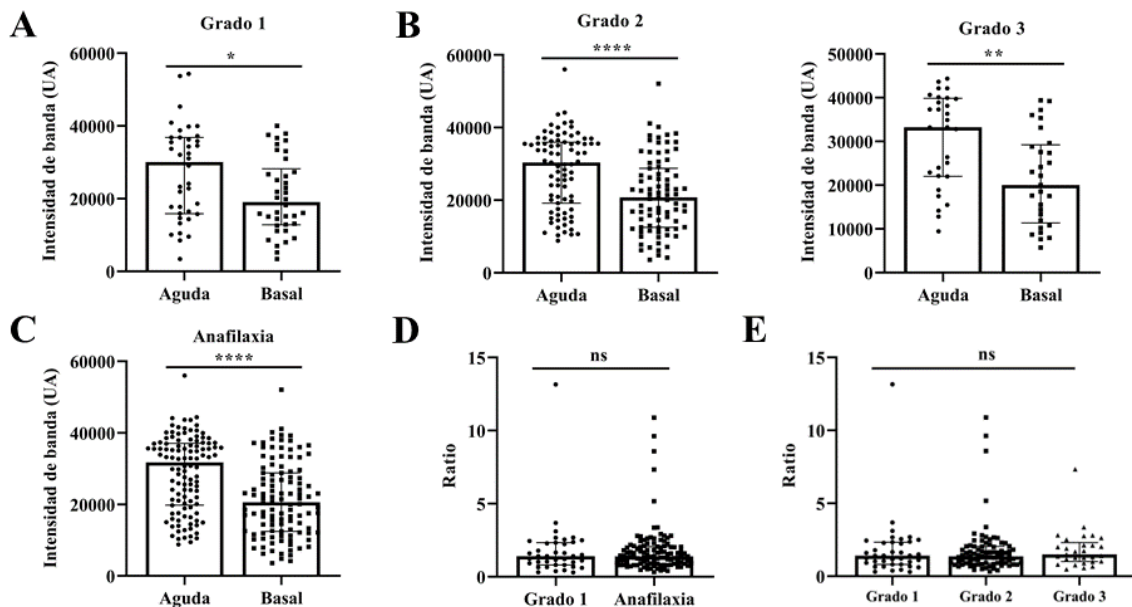


Figura 29. Los niveles séricos de la HBB aumentan en las reacciones de hipersensibilidad. Determinación de los niveles de la HBB en la fase aguda y basal de los individuos con reacciones (A) de Grado 1 (*p: 0.0148), (B) de Grado 2 (****p: <0,0001), de Grado 3 (**p: 0,0012) y (C) en el total de pacientes con anafilaxia (****p: <0,0001). UA: unidades arbitrarias. (D) Comparación de la ratio (aguda/basal) de HBB entre los individuos con reacciones de Grado 1 y con anafilaxia. ns: no significativo. (E) Estratificación de los niveles de HBB en función de la gravedad de la reacción.

5.2. Caracterización del perfil proteómico de las vesículas extracelulares de pacientes con anafilaxia y estudio de su papel en las bases moleculares de la reacción

5.2.1. Pacientes utilizados para el estudio de las vesículas extracelulares en anafilaxia

El estudio de las VEs se realizó en 80 muestras pareadas de plasma obtenidas a partir de 40 pacientes adultos con anafilaxia, cuyas características clínicas se detallan en la **Tabla 6**.

Paciente		Desencadenante		Síntomas					Signos		Gravedad	Tratamiento						
Género	Edad	Grupo	Específico	P	M	D	R	N	C	Fc	SatO ₂	Grado	Epi	H1R	H2R	Cort	β2A	
M	44	Me	AINES	x	x	x				-	-	2		x			x	
H	56	Me	AINES	x	x	x	x			93	93%	2						
H⁽¹⁾	42	Al	Huevo	x	x	x	x	x	x	-	-	3						
M	65	Me	Antibiótico	x	x	x	x			68	95%	2						
M⁽²⁾	51	Me	Antibiótico	x					x	90	95%	2		x			x	
M⁽²⁾	38	Me	Antibiótico	x			x			80	98%	2						
H⁽³⁾	44	Me	AINES	x					x	102	98%	2						
M	31	Me	Quimioterapia	x		x	x			72	88%	3	x	x			x	
M	49	Me	Antibiótico	x	x	x	x			70	94%	2	x				x	
M⁽⁴⁾	46	Me	AINES	x			x	x	x	-	-	3	x	x	x	x	x	
M⁽⁵⁾	20	Al	Frutos secos			x	x		x	105	66%	3					x	
H⁽¹⁾	57	Ot	Idiopática	x	x		x			100	95%	2						
M	57	Me	IBP	x		x		x		-	-	2	x	x			x	
M	29	Me	Analgésico	x			x		x	70	99%	3						
H	47	Me	AINES		x		x	x	x	112	98%	3	x	x			x	
H⁽³⁾	50	Me	Antibiótico	x	x	x	x	x	x	90	92%	3	x	x			x	
M	25	Me	Antibiótico	x			x			85	-	2	x	x			x	
H	47	Me	AINES	x			x		x	78	89%	3	x		x		x	
H	42	Ot	Vacuna	x	x		x			70	97%	2	x	x			x	x
M	51	Al	Pescado	x	x	x	x			70	97%	2	x	x			x	
M	56	Me	Antibiótico	x			x		x	130	70%	3	x	x	x		x	
M	49	Me	AINES	x			x			103	98%	2		x			x	x
H	51	Me	Antibiótico	x		x		x		-	98%	2	x	x			x	
H⁽⁵⁾	73	Me	Contraste	x			x	x	x	-	-	3		x	x	x	x	
H⁽⁴⁾	22	Me	Contraste	x	x		x			71	98%	2	x	x			x	
M	25	Ot	Picadura	x	x		x		x	110	-	3	x	x	x		x	
M	39	Al	Pescado	x		x				-	-	2						
M	22	Me	Antibiótico	x		x	x		x	130	91%	3	x	x				
M	33	Al	Frutos secos	x	x		x			93	98%	2	x	x	x		x	
H	62	Me	IECAS		x	x	x			98	96%	2	x	x	x		x	
M	47	Me	Antibiótico	x		x	x	x	x	86	97%	3						
M	76	Me	Analgésico	x		x	x		x	76	93%	3		x			x	x
H	45	Al	Miel	x	x	x	x			84	98%	2	x	x	x		x	
M	36	Al	Fruta	x	x	x	x		x	100	98%	2	x					
M	25	Al	Fruta	x			x		x	132	96%	2		x			x	
H	33	Me	AINES			x	x			128	95%	2	x	x			x	x
M	37	Me	Antibiótico	x		x	x	x	x	100	94%	2	x					
M	49	Ot	Vacuna	x	x	x	x	x	x	-	98%	2	x	x			x	
H	69	Me	Quimioterapia	x	x		x		x	120	80%	3	x	x			x	x

Tabla 6. Características clínicas de los adultos con anafilaxia utilizados para el estudio de las VEs. M: mujer, H: hombre. Me: medicamentos, Al: alimentos, Ot: otros. AINES: antiinflamatorios no esteroideos, IBP: inhibidores de la bomba de protones, IECAS: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. Fc: frecuencia cardíaca, SatO₂: saturación de oxígeno. P: piel, M: mucosa, D: digestivo, R: respiratorio, N: neurológico, C: cardiovascular. Epi: adrenalina/epinefrina, H1R: antagonista de los receptores 1 de la histamina, H2R: antagonista de los receptores 2 de la histamina, Cort: corticoides, β2A: agonista de los receptores β2 adrenérgicos. Los pacientes utilizados para el estudio proteómico de las VEs por RP-LC-MS/MS se señalan en **negrita**, mientras que los números (¹⁻⁵) indican aquellos analizados en conjunto.

Esta población estaba comprendida entre los 20 y los 76 años ($44,6 \pm 2,3$) y más de la mitad eran mujeres (60%). Los principales desencadenantes de las reacciones fueron los medicamentos (70%) y los alimentos (20%). A su vez, el 62% de los casos se clasificaron

RESULTADOS

como Grado 2, mientras que el 38% restante se catalogaron como Grado 3. Entre las diferentes manifestaciones, las cutáneas (88%) y las respiratorias (83%) fueron las más frecuentes, seguidas de las digestivas (53%), de las cardiovasculares (45%), de las mucosas (38%) y, por último, de las nerviosas (28%). Además, el 78% de los pacientes fueron tratados antes de la obtención de la muestra aguda. En concreto, los antihistamínicos (65%) y los corticoides (65%) fueron los fármacos más utilizados en estos casos, seguidos de la adrenalina (53%) y, por último, de los agonistas de los receptores adrenérgicos β_2 (15%).

5.2.2. Caracterización de las vesículas extracelulares de los pacientes con anafilaxia

La caracterización de las VEs de plasma de pacientes con anafilaxia se llevó a cabo utilizando diferentes técnicas. En primer lugar, su visualización mediante microscopía electrónica reveló partículas de entre 50 y 100 nm de tamaño (**Figura 30A**). A su vez, el NTA, mostró una población heterogénea con un pico a 200 nm (**Figura 30B**). No obstante, no se encontraron diferencias ni en el tamaño ni en la concentración de partículas entre las VEs purificadas de la fase aguda y aquellas de la basal (**Figura 30C-D**). Asimismo, su correcta purificación se confirmó mediante la inmunodetección de las moléculas CD9, CD63, TSG101 y Sintenina 1, siendo todas ellas consideradas marcadores fidedignos de las VEs (**Figura 30E**).

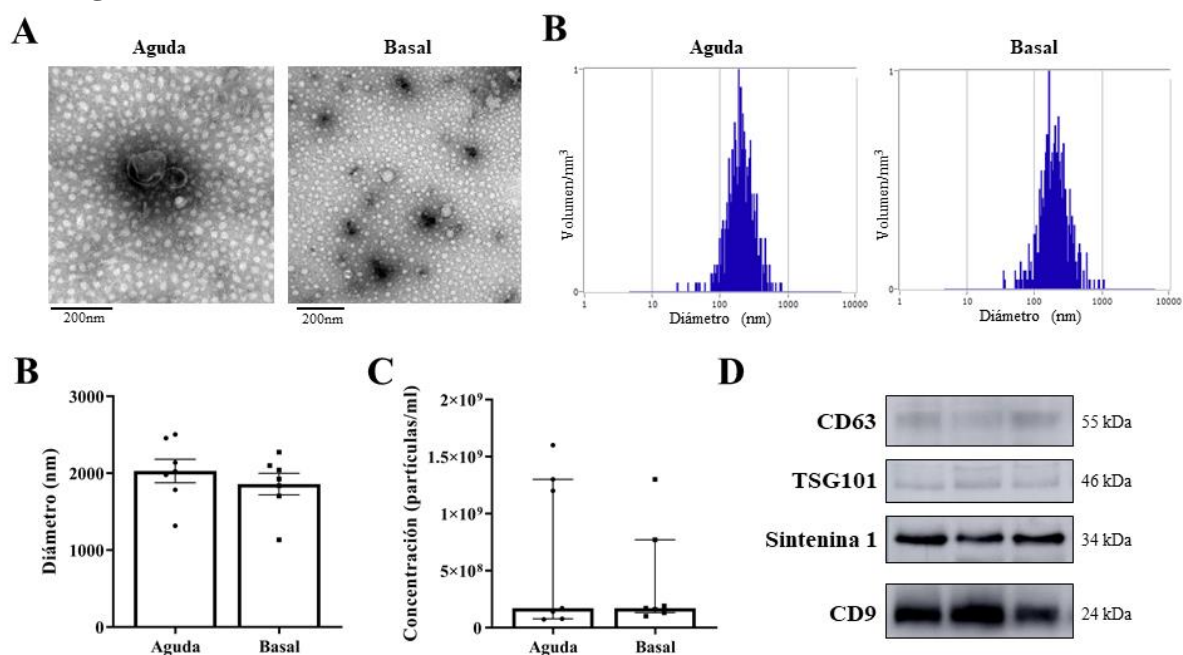


Figura 30. Caracterización de las VEs purificadas a partir de plasma de pacientes con anafilaxia. (A) Imágenes de microscopía electrónica de las VEs obtenidas durante la fase aguda y basal. Escala: 200 nm. (B) Diagrama del tamaño y de la concentración de partículas en las muestras analizadas por NTA. Comparación del (C) tamaño y de la (D) concentración entre las VEs de la fase aguda (N: 7) y basal (N: 7). (E) Inmunodetección de marcadores específicos (CD63, TSG101, Sintenina 1 y CD9) en las VEs de la fase aguda (N: 3). kDa: kilodalton.

5.2.3. Perfil proteómico de las vesículas extracelulares de los pacientes con anafilaxia

El perfil proteómico de las VEs de plasma se determinó mediante espectrometría de masas a partir de las vesículas purificadas de muestras agudas y basales de 5 grupos de pacientes adultos con anafilaxia. En total, se identificaron 1205 proteínas (**Anexo III**), de las cuales, tras el correspondiente análisis estadístico 99 presentaron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre ambas condiciones (**Tabla 7, Figura 31A**). En concreto, 83 de ellas aumentaron durante la fase aguda, mientras que las otras 16 disminuyeron (**Figura 31B**). Además, un 23% habían sido relacionadas previamente con anafilaxia. A su vez, el PCA realizado con

RESULTADOS

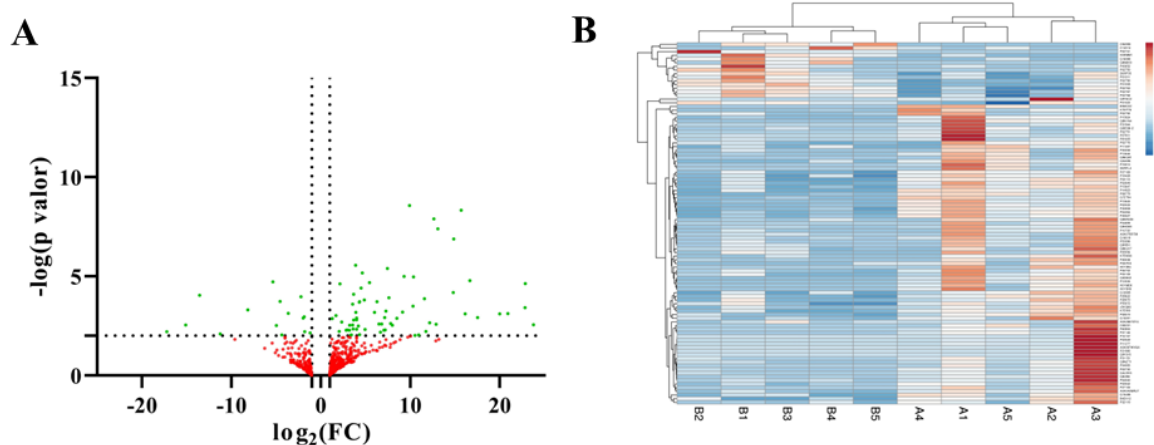
los datos obtenidos reveló una similitud entre las réplicas biológicas y una separación entre las muestras agudas y basales (**Figura 31C**).

Código	Gen	Nombre	PE	log ₂ (FC)	p valor
P19013	KRT4	Queratina citoplasmática 4, tipo II	10	99999,96	1,98E-06
P60953	CDC42	Homólogo de la proteína 42 de control de división celular	4	99804,39	3,00E-06
Q5D862	FLG2	Filagrina 2	11	99652,10	9,71E-07
Q8N1N4	KRT78	Queratina citoplasmática 78, tipo II	7	98281,25	1,47E-05
P31146	CORO1A	Coronina 1A	6	97102,85	9,98E-05
P12035	KRT3	Queratina citoplasmática 3, tipo II	2	97042,07	9,41E-05
P02549	SPTA1	Cadena α de espectrina, eritrocítica 1	55	215,88	6,28E-08
P11277	SPTB	Cadena β de espectrina, eritrocítica	48	167,14	5,29E-07
P27105	STOM	Banda 7 de la proteína integral de la membrana del eritrocito	8	84,40	1,40E-06
K7EPT8	GFAP	Proteína ácida fibrilar glial (fragmento)	1	61,58	7,42E-15
H0YMD0	ANXA2	Anexina (fragmento)	9	35,63	1,99E-04
Q7Z794	KRT77	Queratina citoplasmática 1b, tipo II	9	35,31	2,56E-06
P15924	DSP	Desmoplaquina	43	34,07	9,55E-10
H0Y5H9	SERPINB4	Serpina B4 (fragmento)	7	31,01	4,46E-04
P31944	CASP14	Caspasa 14	11	28,02	4,53E-04
P02751	<i>FN1</i>	<i>Fibronectina</i> ^{196,197}	3	23,79	2,76E-03
P13646	KRT13	Queratina citoplasmática 13, tipo I	8	22,88	2,37E-05
H0Y394	HDLBP	Vigilina (fragmento)	4	22,86	3,79E-04
P04899	GNAI2	Subunidad α-2 de la proteína de unión a nucleótidos de guanina G(i)	9	20,92	7,71E-04
D6RFL4	CD14	Antígeno de diferenciación de monocitos CD14 (fragmento)	5	20,02	7,87E-04
B5MC02	STEAP2	Metalorreductasa STEAP2	2	17,55	1,22E-03
P26038	MSN	Moesina	21	16,68	1,68E-05
P07911	UMOD	Uromodulina	13	16,16	7,90E-04
P02533	KRT14	Queratina citoplasmática 14, tipo I	18	15,72	4,67E-09
Q8IZ83	ALDH16A1	Miembro A1 de la familia 16 de la aldehído deshidrogenasa	20	14,87	1,31E-07
Q9HD89	RETN	Resistina	5	14,83	6,68E-05
P08779	KRT16	Queratina citoplasmática 16, tipo I	22	13,11	4,05E-08
A0A087WVQ6	CLTC	Cadena pesada de clatrina	21	12,92	2,59E-03
P02730	SLC4A1	Banda 3 de la proteína transportadora de aniones	21	12,66	1,27E-08
P81605	DCD	Dermicidina	2	12,18	2,21E-03
Q96QB1	DLC1	Proteína 7 activadora de la GTPasa Rho	2	11,77	6,03E-03
Q4LDE5	SVEP1	Sushi, factor de von Willebrand tipo A, EGF y proteína 1 con dominio de pentaxina	27	11,59	1,35E-04
P04083	<i>ANXA1</i>	<i>Anexina A1</i> ¹⁹⁸	6	10,95	8,92E-03
O00231	PSMD11	Subunidad 11 no ATPasa reguladora del proteasoma 26S	5	10,53	9,65E-03
Q04695	KRT17	Queratina citoplasmática 17, tipo I	12	10,37	1,07E-05
Q00536-2	CDK16	Isoforma 2 de la quinasa 16 dependiente de ciclina	2	10,31	3,25E-04
P13645	KRT10	Queratina citoplasmática 10, tipo I	50	9,94	2,71E-09
P14923	JUP	Placoglobina	22	9,32	1,03E-05
K7EM38	ACTG1	Actina citoplasmática 2 (fragmento)	1	9,15	6,39E-04
P10720	PF4V1	Variante del factor plaquetario 4	1	8,52	1,33E-03
P21980	<i>TGM2</i>	<i>Proteína-glutamina γ-glutamyltransferasa 2</i> ^{175,199,200}	12	8,01	2,97E-03
Q16610	<i>ECM1</i>	<i>Proteína de la matriz extracelular 1</i> ²⁰¹	11	7,82	2,40E-03
Q9NZZ1	CALML5	Proteína similar a la calmodulina 5	10	7,62	1,20E-04
A0A0A0MRJ7	<i>F5</i>	<i>Factor de coagulación V</i> ^{202,203}	52	7,45	4,01E-06
Q9Y6C2	EMILIN1	EMILIN-1	16	7,30	5,68E-04
Q9Y315	DERA	Aldolasa de desoxirribosa-fosfato	13	7,21	5,02E-03
P53396	ACLY	Sintasa de ATP-citrato	17	7,15	1,22E-03
P16157	<i>ANK1</i>	<i>Anquirina 1</i> ²⁰⁴	14	7,07	5,27E-03
P0DP23	CALM1	Calmodulina 1	4	6,81	2,56E-03
P55058	PLTP	Proteína de transferencia de fosfolípidos	5	6,69	6,56E-03
A0A075B738	<i>PECAM1</i>	<i>Molécula de adhesión de las plaquetas a las células endoteliales</i> ²⁰⁵	16	6,50	2,54E-03
P31151	S100A7	Proteína S100-A7	9	6,28	1,90E-04
P05109	<i>S100A8</i>	<i>Proteína S100-A8</i> ²⁰⁶	11	6,02	6,56E-04
P08519	<i>LPA</i>	<i>Apolipoproteína A</i> ²⁰⁷	42	5,45	2,10E-05
B4DV12	UBB	Poliubiquitina B	3	4,96	4,75E-03
P13647	KRT5	Queratina citoplasmática 5, tipo II	18	4,87	1,55E-04
P35527	KRT9	Queratina citoplasmática 9, tipo I	78	4,65	6,73E-06

RESULTADOS

P35908	KRT2	Queratina epidérmica 2, tipo II	57	4,52	3,98E-05
P27169	PON1	Paraoxonasa/arilesterasa sérica 1	14	4,36	1,90E-04
P28070	PSMB4	Subunidad β del proteasoma tipo 4	6	4,35	8,77E-03
P06702	SI00A9	Proteína SI00-A9²⁰⁶	13	4,33	2,04E-04
Q9HBI1	PARVB	β-parvina	8	4,21	3,21E-03
Q8WWZ8	OIT3	Proteína del transcrito 3 inducido por la oncoproteína	14	4,00	1,55E-03
P11597	CETP	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol	11	4,00	1,28E-03
Q12805	EFEMP1	Proteína de la matriz extracelular 1 similar a la fibulina contenida en el EGF	8	4,00	4,63E-03
P18428	LBP	Proteína de unión a lipopolisacáridos	11	3,94	6,50E-04
P04264	KRT1	Queratina citoplasmática 1, tipo II	71	3,90	2,77E-06
<i>P04040</i>	<i>CAT</i>	<i>Catalasa²⁰⁸⁻²¹⁰</i>	<i>36</i>	<i>3,68</i>	<i>1,62E-03</i>
Q13201	MMRN1	Multimerina 1	33	3,67	8,09E-05
P29622	SERPINA4	Calistatina	11	3,62	4,50E-03
J3KQ66	RELN	Reelina	30	3,57	2,89E-03
<i>P04114</i>	<i>APOB</i>	<i>Apolipoproteína B-100²¹¹</i>	<i>264</i>	<i>3,57</i>	<i>2,57E-04</i>
<i>P32119</i>	<i>PRDX2</i>	<i>Peroxiredoxina 2²¹²</i>	<i>9</i>	<i>3,43</i>	<i>8,96E-03</i>
P02792	FTL	Cadena ligera de la ferritina	12	3,34	9,39E-03
K7ERI9	APOC1	Apolipoproteína C-I (fragmento)	6	3,24	2,91E-03
<i>P02776</i>	<i>PF4</i>	<i>Factor plaquetario 4^{213,214}</i>	<i>4</i>	<i>3,22</i>	<i>5,25E-03</i>
P55072	VCP	ATPasa transitoria del retículo endoplásmico	44	2,96	5,08E-03
P02042	HBD	Subunidad δ de la hemoglobina	6	2,85	5,21E-03
Q86UX7	FERMT3	Homólogo 3 de la familia de la fermitina	30	2,35	2,04E-03
<i>P02649</i>	<i>APOE</i>	<i>Apolipoproteína E²⁰⁷</i>	<i>29</i>	<i>2,15</i>	<i>2,44E-05</i>
<i>P05556</i>	<i>ITGB1</i>	<i>Integrina β1²¹⁵</i>	<i>16</i>	<i>2,07</i>	<i>6,01E-03</i>
Q15485	FCN2	Ficolina 2	20	1,70	9,60E-04
A0A286YFY4	IGHG2	Constante pesada gamma 2 de la inmunoglobulina (fragmento)	12	1,28	1,34E-03
<i>P01023</i>	<i>A2M</i>	<i>α-2 macroglobulina²¹⁶</i>	<i>144</i>	<i>-1,18</i>	<i>7,20E-03</i>
<i>P01011</i>	<i>SERPINA3</i>	<i>α-1 antiqumotripsina²¹⁶</i>	<i>15</i>	<i>-1,80</i>	<i>6,16E-03</i>
<i>P02768</i>	<i>ALB</i>	<i>Albúmina sérica^{217,218}</i>	<i>84</i>	<i>-1,85</i>	<i>1,11E-03</i>
D6RF35	GC	Proteína de unión a la vitamina D	30	-1,97	1,29E-03
P02787	TF	Serotransferrina	58	-2,22	1,09E-04
<i>P01008</i>	<i>SERPINC1</i>	<i>Antitrombina III^{219,220}</i>	<i>26</i>	<i>-3,63</i>	<i>7,47E-04</i>
O14514	ADGRB1	Receptor B1 acoplado a proteínas G de adhesión	4	-4,34	9,12E-03
<i>P02790</i>	<i>HPX</i>	<i>Hemopexina²²¹</i>	<i>23</i>	<i>-4,55</i>	<i>1,84E-04</i>
P43652	AFM	Afamina	14	-4,96	3,02E-03
<i>P02763</i>	<i>ORM1</i>	<i>Glicoproteína ácida α-1^{222,223}</i>	<i>6</i>	<i>-5,36</i>	<i>1,89E-05</i>
Q16880	UGT8	1-β-galactosiltransferasa de 2-hidroxiarquilesfingosina	1	-8,15	4,88E-04
P02750	LRG1	Glicoproteína α-2 rica en leucina	6	-11,25	8,16E-03
H3BMM1	MYO9A	Miosina-Ixa no convencional	2	-13,54	8,98E-05
Q8N8K9	KIAA1958	Proteína no caracterizada KIAA1958	2	-15,08	2,86E-03
O94993	SOX30	Factor de transcripción SOX-30	1	-17,22	6,30E-03
<i>P02741</i>	<i>CRP</i>	<i>Proteína C reactiva^{224,225}</i>	<i>4</i>	<i>-96908,15</i>	<i>2,78E-04</i>

Tabla 7. Panel de las 99 proteínas con cambios estadísticamente significativos ($p < 0,01$) entre las VEs de la fase aguda y basal. PE: péptidos específicos. FC: tasa de cambio. En **negrita** se indican las proteínas seleccionadas para su validación en una cohorte mayor de pacientes. A su vez, en *cursiva* se señalan las relacionadas previamente con anafilaxia.



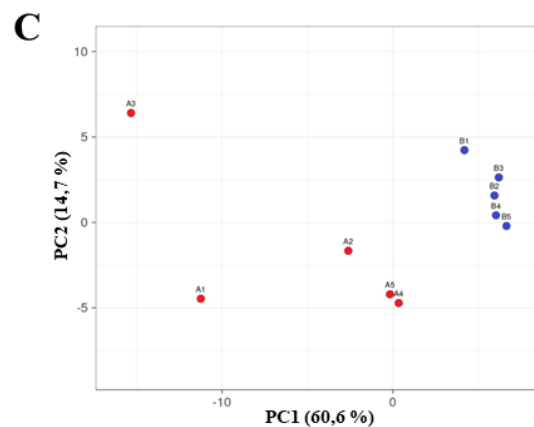
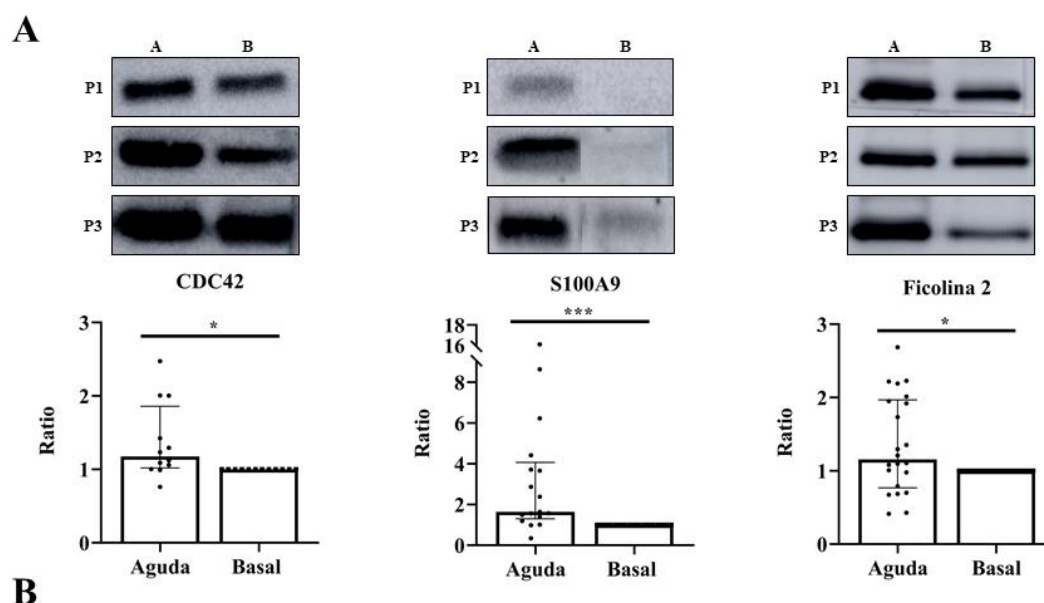


Figura 31. Análisis del perfil proteómico de las VEs purificadas a partir de plasma de pacientes con anafilaxia. A: muestras de la fase aguda, B: muestras de la fase basal (A) Dispersión de todas las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas. Sin embargo, 16 de ellas no se observan en el gráfico de volcán debido a su elevado FC. En verde se muestran aquellas estadísticamente significativas ($p < 0,01$). Las líneas discontinuas indican los criterios de exclusión: al menos el doble de aumento ($FC \geq 1$) o descenso ($FC \leq 1$) durante la fase aguda y un p valor $< 0,01$. (B) Representación mediante mapa de calor de los niveles de las proteínas estadísticamente significativas en cada muestra. En rojo se representa el aumento, mientras que en azul se indica la disminución. (C) Similitud entre las réplicas biológicas y separación entre las VEs de la fase aguda (puntos rojos) y aquellas de la basal (puntos azules). PC: componente principal.

5.2.4. Los niveles de las proteínas CDC42, S100A9 y Ficolina 2 aumentan durante la fase aguda en las vesículas extracelulares de los pacientes con anafilaxia

Entre las diferentes proteínas estadísticamente significativas, se seleccionaron tres de ellas (CDC42, S100A9 y Ficolina 2) para validar sus niveles en una población mayor de pacientes con anafilaxia y confirmar la identificación masiva llevada a cabo previamente. El análisis específico de los valores de CDC42, S100A9 y Ficolina 2 demostró un aumento de estas moléculas en las VEs obtenidas a partir de la fase aguda en comparación con aquellas purificadas de la basal (**Figura 32A**). Además, estos resultados fueron acordes a los datos obtenidos por espectrometría de masas, donde se observó un incremento de estas tres proteínas durante la anafilaxia (**Figura 32B**).



Código	Gen	Nombre	PE	$\log_2(FC)$	p valor
P60953	CDC42	Homólogo de la proteína 42 de control de división celular	4	99804,39	3,00E-06
P06702	S100A9	Proteína S100A9	13	4,33	2,04E-04
Q15485	FCN2	Ficolina 2	20	1,70	9,60E-04

RESULTADOS

Figura 32. Los niveles de CDC42, S100A9 y Ficolina 2 aumentan en las VEs de la fase aguda. (A) Los paneles superiores muestran los Western blot de las proteínas CDC42 (21 kDa), S100A9 (14 kDa) y Ficolina 2 (34 kDa) durante las fases agudas (A) y basales (B) de tres pacientes representativos con anafilaxia (P1, P2 y P3). La gráficas ilustran la comparación (ratio agudo/basal) de los niveles de CDC42 (*p: 0,0161; N: 12), S100A9 (**p: 0,0008; N: 17) y Ficolina 2 (*p: 0,0462; N: 22) entre ambas condiciones. (B) Determinación de los valores de CDC42, S100A9 y Ficolina 2 mediante espectrometría de masas. PE: péptidos específicos, FC: tasa de cambio.

5.2.5. Análisis de biología de sistemas del panel de proteínas diferenciales identificado en las vesículas extracelulares de los pacientes con anafilaxia

La función coordinada de las 99 proteínas significativas se evaluó *in silico* mediante SBA. Para ello, se realizaron dos aproximaciones: una manual basada en la base de datos UniProt y otra mediante IPA.

La primera de ellas reveló que la mayoría de estas proteínas eran extracelulares y que estaban relacionadas funcionalmente con procesos inmunológicos, sugiriendo su posible papel en la comunicación celular y en la regulación de las bases moleculares de la reacción anafiláctica (Figura 33A-B).

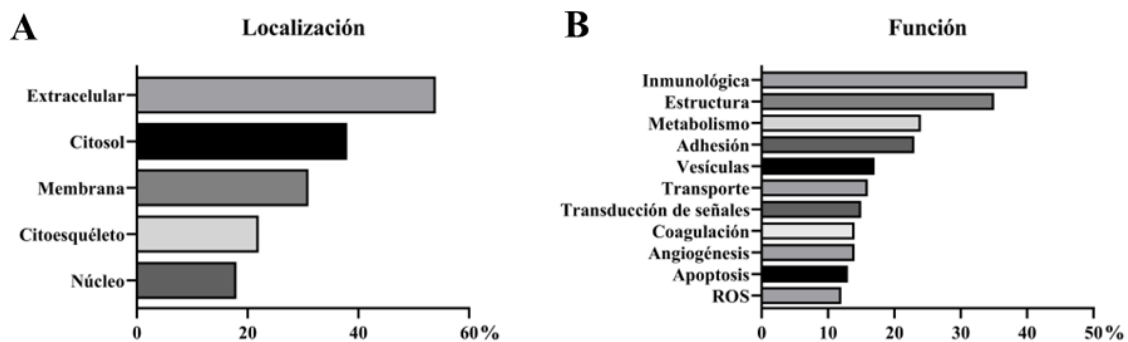


Figura 33. SBA de las 99 proteínas estadísticamente significativas de acuerdo con la base de datos UniProt. Clasificación de las proteínas en función de su (A) localización y (B) función.

A su vez, estos resultados se confirmaron mediante IPA. Precisamente, entre las vías de señalización molecular destacadas, se encontraron varias implicadas en la anafilaxia, como la respuesta de fase aguda y la organización del citoesqueleto de actina. Asimismo, también se identificó la endocitosis mediada por clatrina, un mecanismo estrechamente relacionado con las VEs (Figura 34).

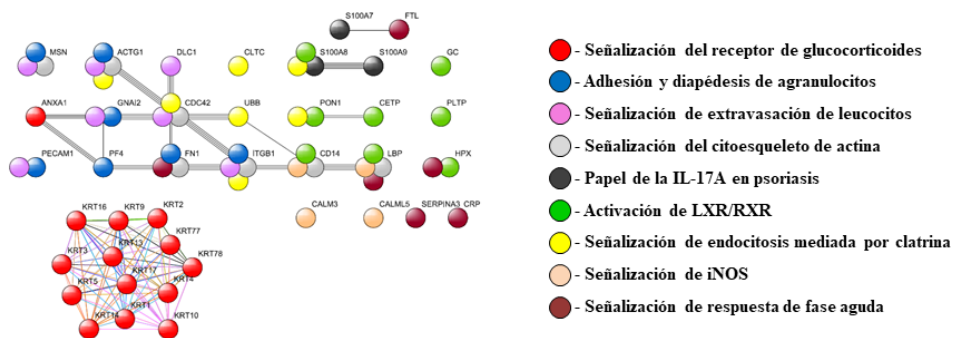


Figura 34. Panel de las vías de señalización canónicas según el IPA. Cada color indica una ruta diferente. Las variaciones en el grosor de las líneas conectivas muestran la evidencia de las interacciones entre las proteínas. LXR: receptor X del hígado, RXR: receptor X de retinoides, iNOS: óxido nítrico sintasa inducible.

Por otra parte, el análisis de las principales “enfermedades y funciones” indicó que estas proteínas participaban en procesos directamente vinculados con la reacción anafiláctica, como la degranulación de las células inmunológicas, la alergia y la inflamación de los órganos (Tabla 8).

Principales enfermedades y funciones	-log(p valor)
Degranulación de células	21,75
Degranulación de neutrófilos	17,82
Queratinización de la epidermis	17,72
Formación de la piel	16,77
Degranulación de fagocitos	16,53
Adhesión de células sanguíneas	15,04
Unión de células sanguíneas	14,99
Adhesión de células inmunológicas	14,50
Inflamación de órganos	14,49
Hipersensibilidad inmediata	14,31
Unión de células mieloides	13,87
Alergia	13,08

Tabla 8. Principales enfermedades y funciones de las 99 proteínas significativas de acuerdo con el IPA.

5.2.6. Las vesículas extracelulares de plasma de pacientes con anafilaxia inducen un aumento de la permeabilidad vascular en células endoteliales humanas

Para analizar el papel de las VEs en la permeabilidad vascular, uno de los principales trastornos acontecidos durante la anafilaxia, se llevaron a cabo ensayos funcionales *in vitro* combinados con tinciones de inmunofluorescencia. En concreto, estas últimas demostraron que existía una interacción entre las CE y las vesículas de los pacientes teñidas previamente con PKH67. A su vez, las VEs se visualizaron en la zona perinuclear, lo que indicó la captación e internalización de estas partículas por parte de las células (**Figura 35**).

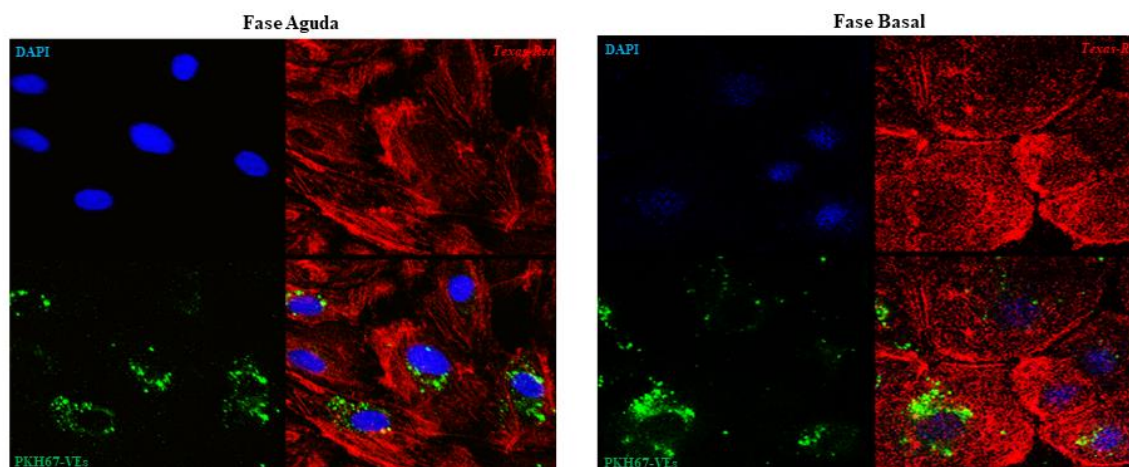


Figura 35. Captación de las VEs de los pacientes con anafilaxia por parte de las CE. Imágenes de inmunofluorescencia de las CE tras 5 horas de incubación con las VEs purificadas a partir de plasma de la fase aguda y basal de un pacientes representativo. De color verde (PKH67) se observan las VEs, de rojo (*Texas-Red*) las fibras de actina del citoesqueleto y de azul (DAPI) los núcleos.

Una vez confirmada su interacción con las CE, se evaluó si estas vesículas tenían un efecto funcional en la permeabilidad endotelial. Precisamente, el análisis de la TEER reveló que a las 5 horas de incubación con las VEs de los pacientes con anafilaxia se observaba una reducción significativa de la resistencia endotelial respecto al control. A su vez, las vesículas purificadas a partir de la fase aguda inducían un descenso mayor que las obtenidas de la basal (**Figura 36A-B**).

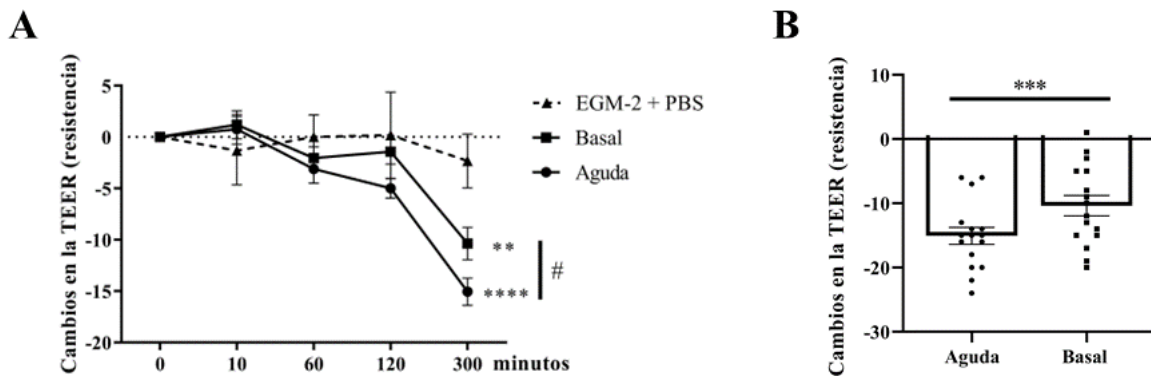


Figura 36. Las VEs de los pacientes con anafilaxia inducen un aumento de la permeabilidad endotelial. (A) Cambios de la TEER tras el estímulo de las CEs durante 5 horas con las VEs purificadas a partir de plasma de la fase aguda (N:16), de la basal (N: 16) y con el control negativo EGM-2 + PBS (N: 6). Las diferencias significativas se observan a los 300 minutos de incubación: VEs de la fase aguda vs EGM-2 + PBS (***p: <0,0001), VEs de la fase basal vs EGM-2 + PBS (**p: 0,0031), VEs de la fase aguda vs VEs de la fase basal (#p: 0,0256). (B) Comparación de los cambios en la TEER tras las 5 horas de incubación con las VEs de la fase aguda y de la basal (***p: 0,0008).

Además, como controles del sistema celular, se evaluaron diferentes moléculas vasoactivas. En concreto, se vio que tanto la trombina como el PAF, ambos agentes desestabilizantes, provocaban una pérdida de la TEER. En cambio, el AMPc, un mediador estabilizante, mantuvo e incluso causó un aumento de estos valores (**Figura 37**).

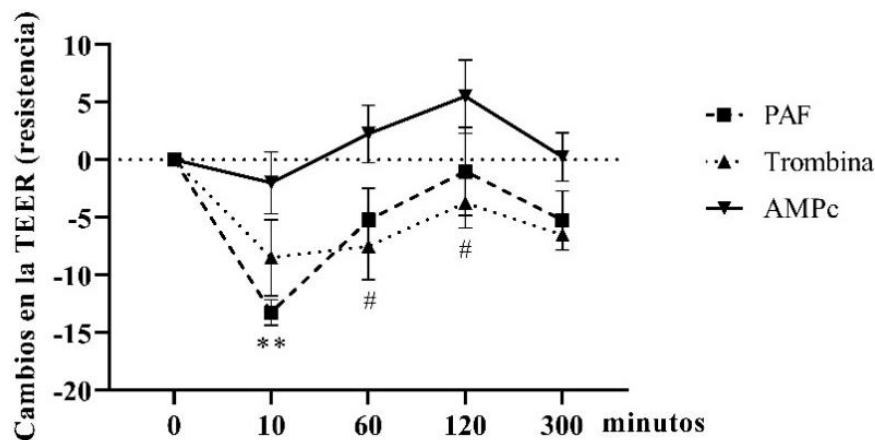


Figura 37. Efecto de los mediadores vasoactivos en la TEER de las CEs. Respuesta frente a los agentes desestabilizantes (PAF 10 μ M y trombina 0,5 μ M) y estabilizantes (AMPc 30 μ M) utilizados como control de la técnica (N:4). PAF vs AMPc a los 10 minutos (**p: 0,0039), Trombina vs AMPc a los 60 minutos (#p: 0,0136) y Trombina vs AMPc a los 120 minutos (#p: 0,0201).

5.2.7. Las células mononucleares de sangre periférica de donantes no atópicos captan las vesículas extracelulares de pacientes con anafilaxia

Debido al posible papel en la regulación de la respuesta inmunitaria del panel de proteínas diferenciales identificado, se decidió evaluar si las VEs de los pacientes con anafilaxia eran captadas por las PBMCs de donantes no atópicos. El análisis llevado a cabo mediante citometría de flujo reveló que la población principal que capturaba estas vesículas eran los monocitos, visualizándose niveles de PKH67 en prácticamente todas las células estudiadas. Asimismo, también se observaron en los linfocitos B, aunque en menor medida. Sin embargo, los linfocitos Th permanecieron inalterados (**Figura 38**).

RESULTADOS

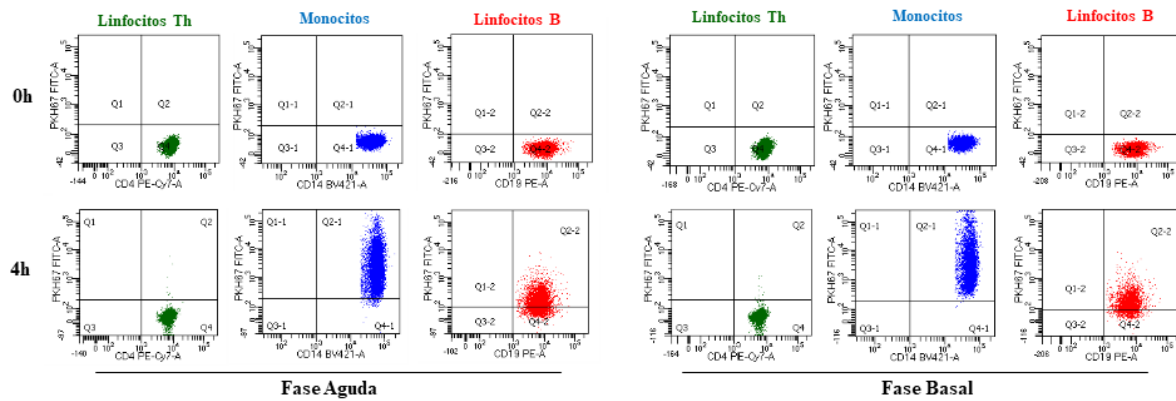
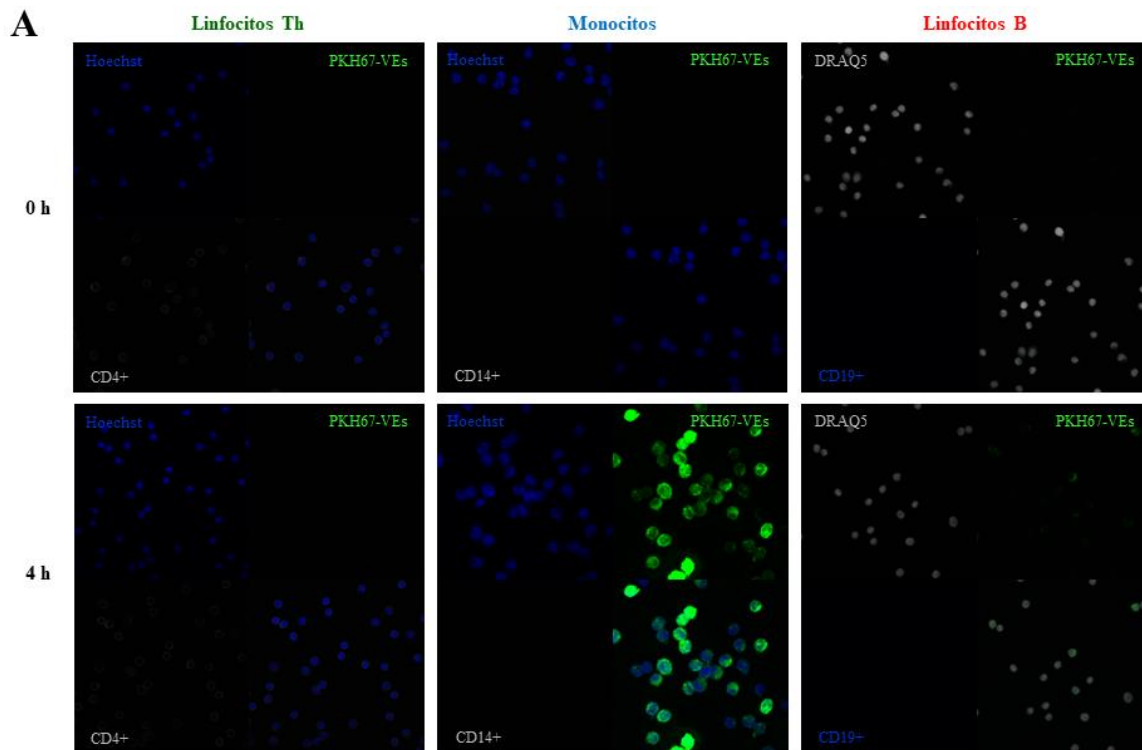


Figura 38. Análisis mediante citometría de flujo de la captación de las VEs de los pacientes con anafilaxia por parte de las PBMCs. Diagramas de citometría de flujo de las diferentes poblaciones de PBMCs en el momento inicial (paneles superiores) y tras las 4 horas de incubación (paneles inferiores) con las VEs de la fase aguda y basal de un paciente representativo. De color verde se observan los linfocitos Th (CD3+ y CD4+), de azul los monocitos (CD14+) y de rojo los linfocitos B (CD19+).

A su vez, para confirmar la internalización de las VEs, se separaron las diferentes poblaciones de PBMCs y se visualizaron mediante tinciones de inmunofluorescencia. Las imágenes obtenidas revelaron una mayor captación de vesículas por parte de los monocitos, de acuerdo con lo observado previamente. Además, estas partículas también se advirtieron en los linfocitos B. No obstante, no se detectaron en los linfocitos Th (**Figura 39**).



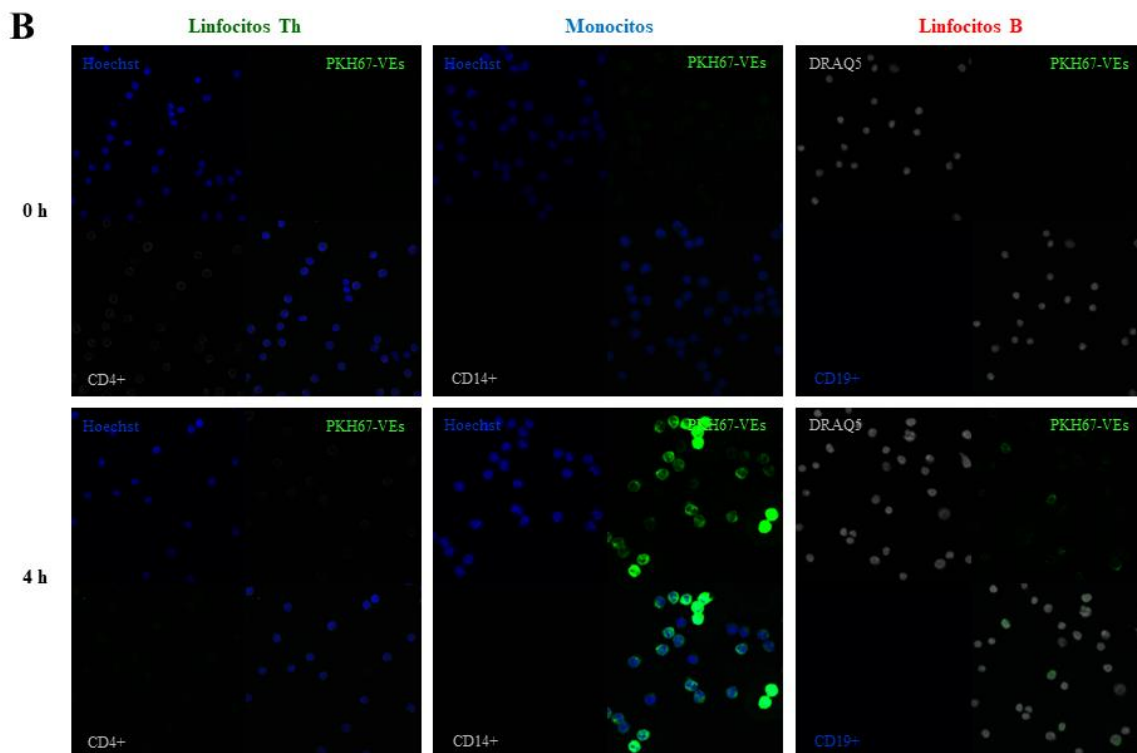


Figura 39. Internalización de las VEs de los pacientes con anafilaxia por las diferentes poblaciones de PBMCs. Imágenes de inmunofluorescencia de las diferentes poblaciones de PBMCs tras las 4 horas de incubación con las VEs purificadas a partir de muestras de la fase (A) aguda y (B) basal de un paciente representativo (N: 3). De color verde (PKH67) se observan las VEs, mientras que los núcleos se visualizan de azul (Hoechst) y gris (DRAQ5). Sin embargo, los anticuerpos de membrana no se detectaron en ninguna de las poblaciones.

Una vez confirmada la captación de las VEs por parte de los monocitos y los linfocitos B, se evaluó si había diferencias en estas células entre la internalización de las vesículas purificadas a partir de la fase aguda y aquellas obtenidas de la basal. Sin embargo, no se encontraron variaciones en ninguno de los casos (**Figura 40A-B**).

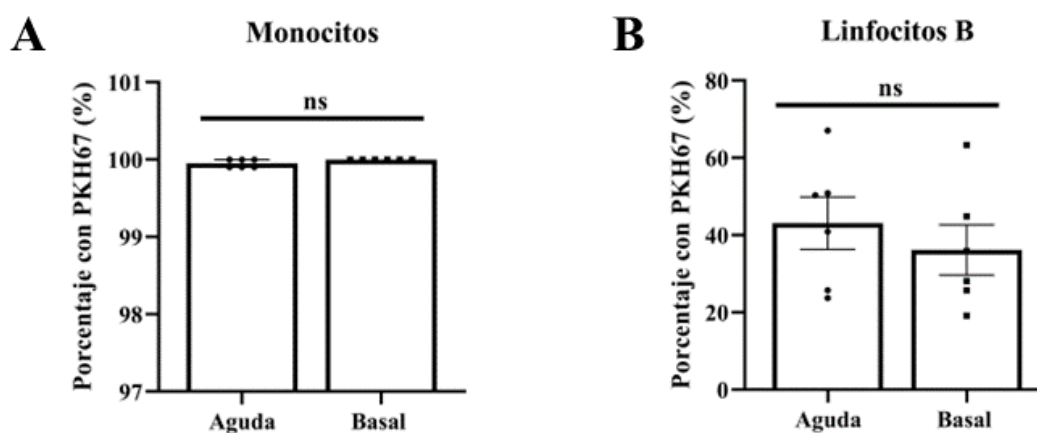


Figura 40. Cuantificación mediante citometría de flujo de la captación de VEs de la fase aguda y basal en las PBMCs. Comparación del porcentaje de (A) monocitos y (B) linfocitos B que internalizan VEs de la fase aguda y basal a las 4 horas de incubación (N: 6).

5.3. Análisis de los niveles de microARNs séricos circulantes en niños con anafilaxia inducida por alimentos

5.3.1. Población pediátrica utilizada para el estudio de los microARNs

El estudio de los miARNs circulantes en niños se llevó a cabo a partir de 38 muestras séricas obtenidas de 19 pacientes pediátricos con anafilaxia inducida por alimentos. Esta población estaba comprendida entre los 4 y 17 años ($11,3 \pm 0,92$) y más de la mitad eran mujeres (58%). Además, todas las reacciones fueron provocadas por alimentos. En concreto, los principales agentes causantes fueron la leche (37%) y el huevo (26%). Sin embargo, el 37% de las anafilaxias restantes se debieron a otros alérgenos conocidos. En cuanto a las manifestaciones clínicas, los síntomas respiratorios (95%) y cutáneos (79%) fueron los más frecuentes, seguidos de los digestivos (58%), los cardiovasculares (21%) y, por último, los nerviosos (11%). Asimismo, el 11% de las reacciones se clasificaron como graves (Grado 3) mientras que el 89% restante fueron catalogadas como moderadas (Grado 2). Además, en más de la mitad de los pacientes (53%) se administró el tratamiento antes de la obtención de la muestra aguda, siendo la adrenalina (90%) y los antihistamínicos (80%) los medicamentos más utilizados en estos casos. En la **Tabla 8** se muestra una descripción detallada de las características clínicas de todos los pacientes.

Pacientes		Desencadenante		Síntomas					Signos		Gravedad	Tratamiento					
Edad	Género	Grupo	Específico	P	M	D	R	N	C	Fc	SatO ₂	Grado	Epi	H1R	H2R	Cort	β2A
17	M	Al	Leche	x	x					69	-	2					
11	M	Al	Huevo			x	x			-	-	2	x				
4	H	Al	Anacardo	x	x		x		x	136	98%	2					
5	M	Al	Gallo	x			x			83	98%	2		x			x
9	M	Al	Leche			x	x			83	99%	2	x				
9	H	Al	Huevo	x		x	x		x	135	98%	2					
14	M	Al	Huevo	x	x	x	x	x	x	56	99%	3					
11	M	Al	Leche	x	x		x			89	97%	2					
15	H	Al	Queso	x			x			57	96%	2					
13	M	Al	Leche			x	x			77	98%	2					
5	H	Al	Leche	x		x	x		x	85	94%	3	x	x		x	x
14	H	Al	Huevo	x	x	x	x			81	98%	2					
10	M	Al	Huevo	x	x		x			117	-	2					
14	M	Al	Nuez	x	x		x	x		96	99%	2	x	x		x	
7	H	Al	Gallo			x	x			85	98%	2	x	x		x	
14	M	Al	Leche	x		x	x			107	97%	2	x	x		x	x
11	M	Al	Leche			x	x			100	99%	2	x	x			x
15	H	Al	Cacahuete	x	x	x	x			93	99%	2	x	x	x	x	
17	H	Al	Avellana			x	x			90	100%	2	x	x			

Tabla 8. Características clínicas de los 19 pacientes pediátricos con anafilaxia inducida por alimentos. M: mujer, H: hombre. Al: alimentos. Fc: frecuencia cardíaca, SatO₂: saturación de oxígeno. P: piel, M: mucosa, D: digestivo, R: respiratorio, N: neurológico, C: cardiovascular. Epi: adrenalina/epinefrina, H1R: antagonista de los receptores 1 de la histamina, H2R: antagonista de los receptores 2 de la histamina, Cort: corticoides, β2A: agonista de los receptores β2 adrenérgicos. En **negrita** se indican los pacientes utilizados en el NGS.

5.3.2. Caracterización del perfil de microARNs séricos circulantes en niños con anafilaxia inducida por alimentos

El perfil de miARNs séricos circulantes se caracterizó mediante NGS a partir de las muestras agudas y basales de 5 niños con anafilaxia por alimentos. En total se identificaron 388 miARNs (**Anexo IV**) y se realizaron diferentes controles de calidad para evaluar el correcto funcionamiento de la técnica (**Anexo V**).

RESULTADOS

La dispersión de todos los miARNs encontrados se muestra en la **Figura 41A**. No obstante, tras el análisis estadístico, solo 41 de ellos presentaron diferencias significativas ($p: <0,05$) entre ambas condiciones (**Tabla 9** y **Figura 41B**). Concretamente, 21 aumentaron durante la fase aguda, mientras que los otros 20 disminuyeron (**Figura 41C**). A su vez, el PCA reveló una similitud entre las réplicas biológicas y una separación entre las muestras agudas y basales (**Figura 41D**).

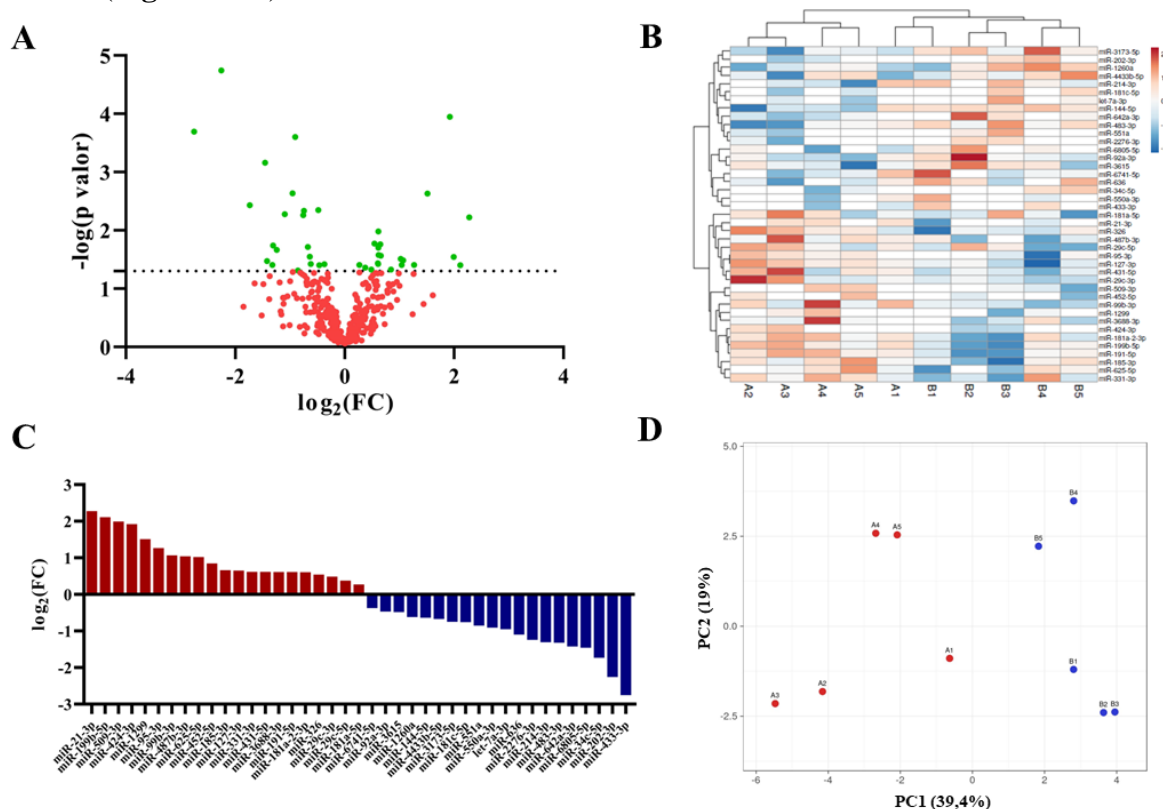


Figura 41. Perfil de miARNs séricos circulantes en la población pediátrica. A: muestras de la fase aguda, B: muestras de la fase basal. (A) Dispersión de todos los miARNs identificados por NGS. Entre ellos, los 41 estadísticamente significativos se indican en verde ($p: <0,05$). (B) Representación gráfica de los niveles de los miARNs estadísticamente significativos en cada muestra. Las unidades del mapa de calor indican los datos de abundancia transformados (\log_2) y normalizados (método *Cyclic Loess*). En rojo se señala el aumento y en azul la disminución. (C) Distribución en función de su FC de los 21 miARNs aumentados (rojo) y de los 20 disminuidos (azul) en la fase aguda respecto a la basal. (D) PCA donde se representa la similitud entre las réplicas biológicas y la separación entre la condición aguda (puntos rojos) y basal (puntos azules). PC: componente principal.

miARN	Secuencia	$\log_2(FC)$	p valor	FDR
miR-21-3p	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU	2,278	0,006	0,154
miR-199b-5p	CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC	2,112	0,040	0,342
miR-509-3p	UGAUUGGUACGUCUGUGGGUAG	1,992	0,029	0,342
miR-424-3p	CAAAACGUGAGGCGCUGCUAU	1,922	0,000	0,000
miR-1299	UUCUGGAAUUCUGUGAGGGA	1,513	0,002	0,083
miR-95-3p	UUCAACGGGUUUUAUUGAGCA	1,268	0,039	0,342
miR-99b-3p	CAAGCUCGUGUCUGUGGGUCCG	1,069	0,033	0,342
miR-487b-3p	AAUCGUACAGGGUCAUCCACUU	1,042	0,039	0,342
miR-625-5p	AGGGGAAAGUUCUAUAGUCC	1,023	0,031	0,342
miR-452-5p	AACUGUUUGCAGAGGAAACUGA	0,848	0,047	0,356
miR-185-3p	AGGGCUGGCUUCCUCUGGUC	0,660	0,027	0,342
miR-127-3p	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU	0,653	0,017	0,294
miR-331-3p	GCCCCUGGGCCUAUCCUAGAA	0,620	0,027	0,342
miR-431-5p	UGUCUUGCAGGCCGUAUGCA	0,616	0,020	0,300
miR-3688-3p	UAUGGAAAGACUUUGCCACUCU	0,614	0,010	0,214
miR-191-5p	CAACGGAUCCCAAAGCAGCUG	0,610	0,038	0,342
miR-181a-2-3p	ACCACUGACCGUUGACUGUACC	0,607	0,037	0,342
miR-326	CCUCUGGGCCCUUCCUCCAG	0,545	0,017	0,294

RESULTADOS

miR-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	0,488	0,047	0,356
miR-29c-5p	UGACCGAUUUCUCCUGGUGUUC	0,377	0,044	0,356
miR-181a-5p	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	0,270	0,039	0,342
miR-6741-5p	GUGGGUGUCUGGUGGGAGCCGUG	-0,372	0,038	0,342
miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCCGCCUGU	-0,466	0,040	0,342
miR-3615	UCUCUCGGCUCUCCUGCGGCUC	-0,483	0,004	0,083
miR-1260a	AUCCCACCUCUGCCACCA	-0,620	0,038	0,342
miR-144-5p	GGAUUCAUCAUAUACUGUAAG	-0,638	0,028	0,342
miR-4433b-5p	AUGUCCCACCCCCACUCCUGU	-0,672	0,019	0,300
miR-3173-5p	UGCCUGCCUGUUUUCUCCUUU	-0,745	0,005	0,083
miR-181c-5p	AACAUUCAACCUGUCGGUGAGU	-0,757	0,006	0,083
miR-551a	GCGACCCACUCUUGGUUUCCA	-0,854	0,049	0,356
miR-550a-3p	UGUCUUACUCCUCAGGCACAU	-0,906	0,000	0,000
let-7a-3p	CUAUACAAUCUACUGUCUUUC	-0,954	0,002	0,083
miR-636	UGUGCUUGCUCGUCCCGCCGCA	-1,097	0,005	0,083
miR-2276-3p	UCUGCAAGUGUCAGAGGCGAGG	-1,243	0,022	0,333
miR-214-3p	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	-1,307	0,018	0,300
miR-483-3p	UCACUCCUCUCCUCCCGUCUU	-1,323	0,039	0,333
miR-642a-3p	AGACACAUUUGGAGAGGGAACC	-1,420	0,034	0,342
miR-6805-5p	UAGGGGGCGGCUUGUGGAGUGU	-1,456	0,001	0,000
miR-34c-5p	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC	-1,734	0,004	0,083
miR-202-3p	AGAGGUUAUAGGGCAUGGGAA	-2,257	0,000	0,000
miR-433-3p	AUCAUGAUGGGCUCCUCGGUGU	-2,752	0,000	0,000

Tabla 9. Panel de los 41 miARNs estadísticamente significativos entre la fase aguda y basal de los niños con anafilaxia por alimentos. FC: tasa de cambio. FDR: tasa de error. En **negrita** se indican los miARNs seleccionadas para su validación en una cohorte mayor de pacientes.

Por otra parte, tras una búsqueda bibliográfica llevada a cabo en PubMed, se observó que solo el miR-181a había sido descrito previamente en anafilaxia, aunque el 34% se habían relacionado con otras condiciones alérgicas (**Tabla 10**).

miARN	Condición alérgica	miARN	Condición alérgica
miR-21-3p	As, DC, Rn, EoE, DA ²²⁶⁻²³⁵	miR-199b-5p	
miR-509-3p		miR-424-3p	Ps ²³⁶
miR-1299	Rn ²³⁷	miR-95-3p	
miR-99b-3p		miR-487b-3p	As, Rn ^{238,239}
miR-625-5p	As ²⁴⁰	miR-452-5p	As ²⁴¹
miR-185-3p		miR-127-3p	IA ²⁴²
miR-331-3p		miR-431-5p	
miR-3688-3p		miR-191-5p	
miR-181a-2-3p	Rn, As, DA, IA ^{175,243-246}	miR-326	As ²⁴⁷
miR-29c-3p	As ^{248,249}	miR-29c-5p	
miR-181a-5p	Rn, As, DA, IA ^{175,243-246}	miR-6741-5p	
miR-92a-3p	Rn, As ²⁵⁰	miR-3615	
miR-1260a	As ²⁵¹	miR-144-5p	As ²⁵²
miR-4433b-5p		miR-3173-5p	
miR-181c-5p		miR-551a	
miR-550a-3p		let-7a-3p	
miR-636		miR-2276-3p	
miR-214-3p		miR-483-3p	
miR-642a-3p		miR-6805-5p	
miR-34c-5p		miR-202-3p	
miR-433-3p			

Tabla 10. Revisión bibliográfica de los antecedentes en el campo de la alergia de los 41 miARNs significativos. Toda la búsqueda se ha llevado a cabo en Pubmed. As: asma, DC: dermatitis de contacto, Rn: rinitis, EoE: esofagitis eosinofílica, DA: dermatitis atópica, Ps: psoriasis, IA: inflamación alérgica. En **negrita** se indican los miARNs seleccionadas para su validación en una cohorte mayor de pacientes.

5.3.3. Los niveles séricos del miR-21-3p y el miR-487b-3p aumentan durante la fase aguda de la reacción en niños con anafilaxia por alimentos

Entre los diferentes miARNs significativos identificados por NGS, se eligieron 6 de ellos (miR-21-3p, miR-487b-3p, miR-191-5p, miR-4433b-5p, miR-483-3p y miR-433-3p) para validar sus niveles en una población mayor de pacientes. En consecuencia, el estudio se amplió hasta un total de 19 niños con anafilaxia por alimentos.

No obstante, antes de determinar los valores de los miARNs de interés, se evaluó la calidad de las muestras y el correcto desarrollo de las técnicas utilizadas. En primer lugar, se calculó el grado de hemólisis presente en el suero mediante el coeficiente entre el miR-451a y el miR-23a-3p. Los resultados obtenidos demostraron que ninguna de las muestras superaba el umbral de referencia (≥ 7 ciclos) por lo que todas presentaban condiciones adecuadas para su estudio (**Figura 42A**). Tras esto, se valoró el correcto desarrollo de las técnicas mediante el uso de controles exógenos. Los UniSp2, UniSp4 y UniSp5 se detectaron con una diferencia escalonada de entre 5 y 7 ciclos, confirmando la apropiada extracción de los miARNs a partir de suero (**Figura 42B**). Asimismo, el UniSp6 se amplificó en torno al ciclo 18, demostrando que la RT se había realizado adecuadamente (**Figura 42C**).

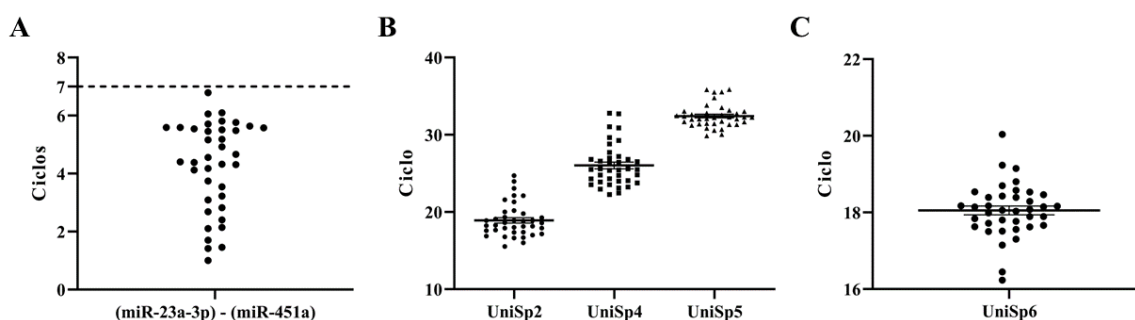
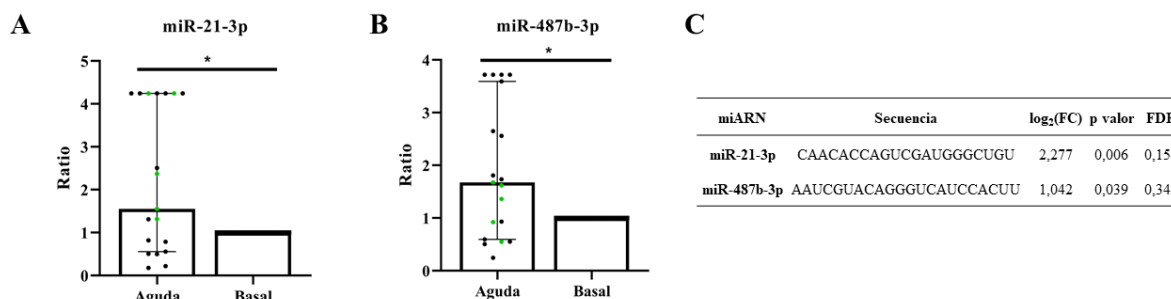


Figura 42. Controles del estudio de los miARNs séricos circulantes en niños con anafilaxia por alimentos. (A) La hemólisis de las muestras se evaluó mediante el coeficiente entre el miR-23a-3p y el miR-451a. (B) La calidad de la extracción del ARN se verificó a través del uso de los controles exógenos UniSp2, UniSp4 y UniSp5. (C) El correcto desarrollo de la RT se confirmó mediante la medida del control exógeno de la técnica, el UniSp6.

Una vez confirmada la calidad de las muestras y el correcto desarrollo de las técnicas, se determinaron los niveles de los miARNs de interés. Los resultados obtenidos demostraron un aumento significativo del miR-21-3p y del miR-487b-3p en la fase aguda respecto a la basal (**Figura 43A-B**). Además, estos valores coincidían con los datos derivados del NGS, donde se observó un claro aumento de ambas moléculas durante la anafilaxia en los niños con reacciones por alimentos (**Figura 43C**). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ambas condiciones en los otros miARNs analizados (**Figura 43D**).



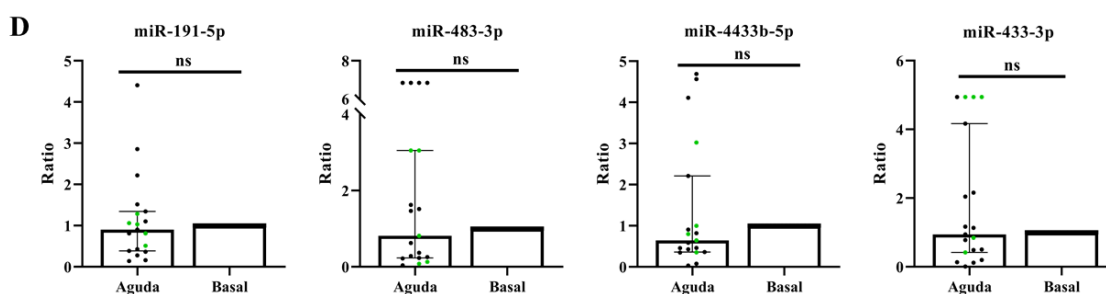


Figura 43. Determinación de los niveles de miARNs séricos circulantes en los 19 pacientes pediátricos con anafilaxia por alimentos. Cuantificación de los niveles (ratio agudo/basal) del (A) miR-21-3p (*p: 0,0251) y del (B) miR-487b-3p (*p: 0,0155) en niños con anafilaxia mediada por alimentos. Los pacientes incluidos en el NGS se indican en verde. (C) Determinación de los valores de miR-21-3p y miR-487b-3p por NGS. FC: tasa de cambio. FDR: tasa de error. (D) Cuantificación de los niveles (ratio agudo/basal) del miR-191-5p (p: 0,7381), miR-4433b-5p (p: 0,7086), miR-483-3p (p: 0,5344) y miR-433-3p (p: 0,3673) en niños con anafilaxia mediada por alimentos. Los pacientes incluidos en el NGS se indican en verde. ns: no significativo.

5.3.4. Análisis de biología de sistemas del miR-21-3p y del miR-487b-3p

Una vez confirmado el aumento durante la fase aguda del miR-21-3p y del miR-487b-3p, se identificaron sus genes diana (595 y 31, respectivamente) y se utilizaron para evaluar mediante IPA la posible implicación de ambos miARNs en los mecanismos moleculares subyacentes a la reacción anafiláctica.

El análisis del miR-21-3p reveló varios procesos biológicos relacionados con la fisiopatología de la anafilaxia. Precisamente, las enfermedades y funciones más destacadas fueron la respuesta inflamatoria, la función del sistema nervioso y las lesiones y anomalías del organismo. Además, entre las vías de señalización canónicas de este miARN, se describieron varias (Rac, TNFR1/2, April y CD27) asociadas con este evento patológico (Tabla 11).

Principales enfermedades y funciones	z-score
Cáncer, respuesta inflamatoria, lesiones y anomalías del organismo	43
Desarrollo y función del sistema nervioso, morfología de los órganos, morfología de los tejidos	31
Supervivencia y muerte celular, lesiones y anomalías del organismo, necrosis renal/muerte celular	29

Vías de señalización canónicas	-log(p valor)
Mecanismos moleculares del cáncer	2,95
Señalización de Rac	2,82
Señalización del TNFR1	2,77
Señalización mediada por APRIL	2,55
Señalización del BAFF	2,5
Resistencia al ácido dependiente del glutamato	2,39
Señalización del TNFR2	2,34
Señalización de CD27 en los linfocitos	2,29
Señalización del EGF	2,25
Control del ciclo celular de la replicación cromosómica	2,24
Activación de RAR	2,15
Vía de recuperación del piridoxal 5'-fosfato	2,11
Degradación del glutamato a través del 4-aminobutirato (III)	2
Señalización de los receptores <i>Toll-like</i> (TLR)	1,98
Inhibición de la función de los RXR mediada por LPS/IL-1	1,98
Vía de señalización BMP	1,89
Señalización del PDGF	1,88
Señalización de las ceramidas	1,86
Señalización de RANK en los osteoclastos	1,86
Regulación de la expresión de IL-2 en linfocitos T activados y anérgicos	1,85

RESULTADOS

Tabla 11. IPA del miR-21-3p. “Principales enfermedades y funciones” y “vías señalización canónicas” más significativas para los 595 genes diana del miR-21-3p. TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral (TNF), BAFF: factor activador de linfocitos B, APRIL: ligando inductor de la proliferación, RAR: receptor de ácido retinoico, LPS: lipopolisacárido/endotoxina, BMP: proteína morfogénica ósea, PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas, RANK: receptor activador del factor nuclear κ B (NF- κ B).

Por otra parte, las enfermedades y funciones más destacadas en el análisis del miR-487b-3p fueron las enfermedades dermatológicas, el ensamblaje celular y la función del sistema nervioso. Estos mecanismos podrían relacionarse con la anafilaxia sugiriendo un papel de este miARN en la regulación de las bases moleculares de la reacción. Asimismo, como en el caso del miR-21-3p, el estudio de las vías de señalización canónicas reveló varios procesos asociados a este evento patológico como la degradación de la histamina, la señalización de la IL-9 y el papel de JAK2 en la señalización de citoquinas (**Tabla 12**).

Principales enfermedades y funciones	z-score
Cáncer, enfermedades y afecciones dermatológicas, lesiones y anomalías del organismo	31
Ensamblaje y organización celular, trastornos del desarrollo, replicación y reparación del ADN	20
Desarrollo y función del sistema nervioso, morfología de los órganos, morfología de los tejidos	17

Vías de señalización canónicas	-log(p valor)
Metabolismo de la tironamina y la yodotironamina	2,39
Degradación de la anandamida	2,39
Metabolismo de la hormona tiroidea I (a través de la deiodinación)	2,39
Biosíntesis de Acetil-CoA I (Complejo piruvato deshidrogenasa)	2,02
Mecanismos moleculares del cáncer	1,80
Degradación del dermatán sulfato (Metazoos)	1,64
Degradación de la histamina	1,64
Degradación oxidativa del etanol (III)	1,59
α -oxidación de los ácidos grasos	1,57
Degradación de la putrescina (III)	1,55
Degradación del etanol (IV)	1,51
Degradación del triptófano a través de la triptamina (X)	1,47
Vía de señalización hepática de la apelina	1,46
Degradación de la dopamina	1,40
Degradación del etanol (II)	1,37
Señalización de la IL-9	1,36
Función de JAK2 en la señalización de citoquinas de tipo hormonal	1,34
Biosíntesis de retinoides I	1,34
Degradación de la adrenalina y noradrenalina	1,33
Metabolismo de la hormona tiroidea (II)	1,30

Tabla 12. IPA del miR-487b-3p. “Principales enfermedades y funciones” y “vías de señalización canónicas” más significativas para los 31 genes diana del miR-487b-3p.

5.3.5. El miR-21-3p aumenta tras la incubación de las células endoteliales en condiciones anafilácticas

La anafilaxia es una reacción sistémica en la que hay una gran variedad de tipos celulares implicados. Por lo tanto, debido a la importancia del componente vascular en el desarrollo de este evento patológico, se decidió evaluar la contribución de las CEs a los niveles circulantes del miR-21-3p y del miR-487b-3p.

En primer lugar, se determinaron los valores intracelulares de ambos miARNs tras las 2 horas de incubación en condiciones de anafilaxia *in vitro*. En el caso del miR-21-3p, sus niveles aumentaron en las CEs estimuladas con el cóctel de mediadores (histamina, PAF y trombina) y con el suero de la fase aguda, pero no con el de la basal. Además, se observó

RESULTADOS

una elevación significativa de sus valores entre las células incubadas con las muestras de la fase aguda y de la basal (**Figura 44A**). Sin embargo, los niveles intracelulares del miR-487b-3p no variaron en ninguno de los casos (**Figura 44B**).

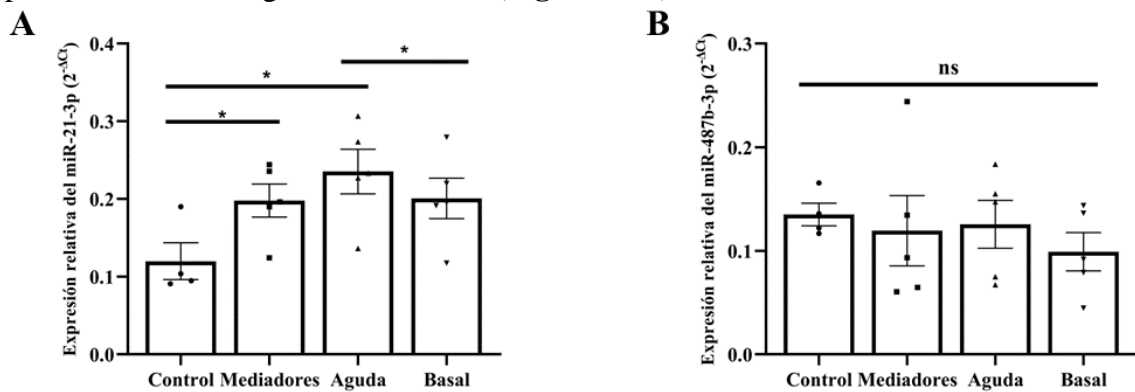


Figura 44. Niveles intracelulares del miR-21-3p y del miR-487b-3p tras la incubación con estímulos anafilácticos. Control (N: 4): medio EGM-2, Mediadores (N: 5): histamina 1 μ M, PAF 10 μ M y trombina 0,5 μ M, Aguda (N: 5): suero de la fase aguda de los pacientes con anafilaxia, Basal (N:5): suero de la fase basal de los pacientes con anafilaxia. Niveles intracelulares (A) del miR-21-3p y (B) del miR-487b-3p tras la incubación de las CEs durante 2 horas en condiciones anafilácticas. Las diferencias significativas se encontraron solo en el caso del miR-21-3p: Control vs Mediadores (*p: 0,0436), Control vs Aguda (*p: 0,02) y Aguda vs Basal (*p: 0,0393). ns: no significativo.

Por otra parte, se midieron los niveles séricos del miR-21-3p y del miR-487b-3p antes y después del contacto con las CEs. Precisamente, los valores del miR-21-3p aumentaron en las muestras de la fase aguda tras las 2 horas de incubación con las células. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el caso de la basal, aunque sí que parecía existir una tendencia al alza (**Figura 45A**). A su vez, al igual que ocurría intracelularmente, no se encontraron cambios significativos en los niveles séricos del miR-487b-3p tras el contacto con las CEs (**Figura 45B**).

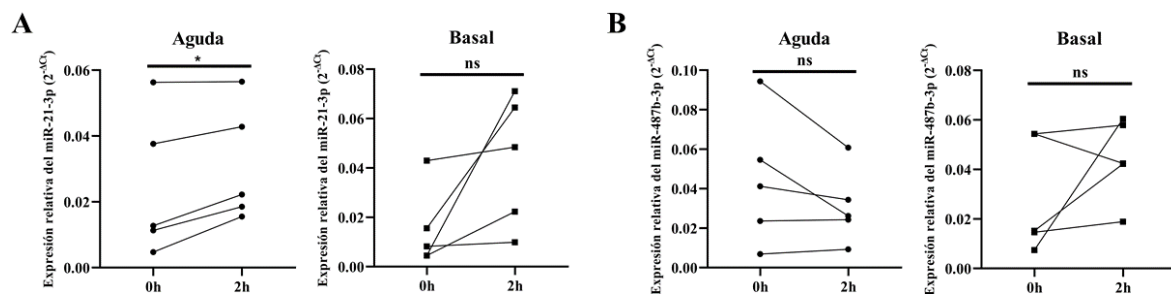


Figura 45. Niveles séricos del miR-21-3p y del miR-487b-3p tras el contacto con las CEs. Niveles (A) del miR-21-3p y (B) del miR-487b-3p en el suero de la fase aguda y basal, antes (0 horas) y después (2 horas) del contacto con las CEs (*p: 0,0241). ns: no significativo.

Además, en todos los casos, se confirmó el correcto desarrollo de las técnicas mediante el uso de controles exógenos. La calidad de la RT del ARN intracelular se evaluó utilizando el UniSp6 (**Figura 46A**). A su vez, la apropiada extracción y RT del ARN sérico se determinó a través de los UniSp2, UniSp4, UniSp5 y UniSp6 (**Figura 46B-C**).

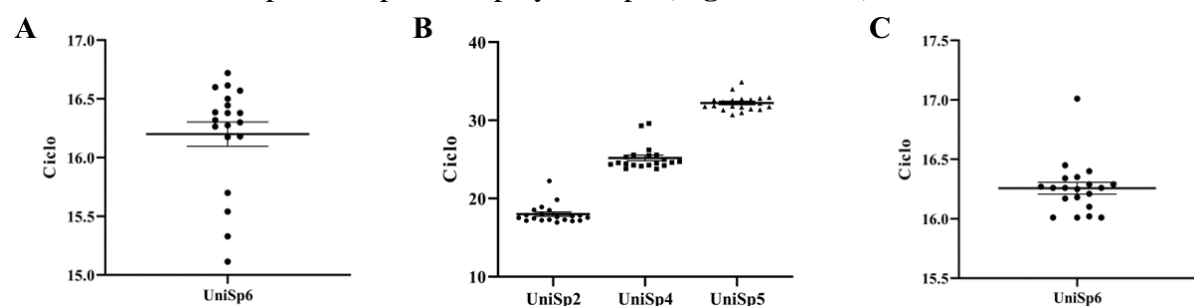


Figura 46. Controles de calidad de las técnicas utilizadas para el estudio de los niveles intracelulares y séricos del miR-21-3p y del miR-487b-3p. (A) La calidad de la RT del ARN intracelular se determinó mediante el control exógeno de la técnica, el UniSp6. (B) La correcta extracción del ARN a partir de suero se confirmó utilizando los controles exógenos de la técnica (UniSp2, UniSp4 y UniSp5). (C) La calidad de la RT del ARN sérico se evaluó mediante el control exógeno de la técnica, el UniSp6.

5.3.6. Caracterización de las vesículas extracelulares purificadas a partir de suero de niños con anafilaxia por alimentos

Debido al aumento en suero del miR-21-3p tras el contacto con las CE y a la capacidad de estas células de liberar VEs cuando se activan²⁵³, se estudiaron los niveles de los miARNs transportados por vesículas en niños con anafilaxia por alimentos.

Para ello, primero se purificaron las VEs a partir de suero de la fase aguda y basal y se caracterizaron mediante diferentes técnicas. El aislamiento de estas vesículas se confirmó a través de la detección de las proteínas CD9, CD63 y TSG101 (**Figura 47A**). Además, las imágenes de microscopía electrónica mostraron partículas de entre 50 y 100 nm, similar a el caso de las VEs purificadas a partir de plasma (**Figura 47B**). A su vez, el NTA reveló una población heterogénea y un pico a aproximadamente 130 nm (**Figura 47C**). No obstante, no se encontraron diferencias en el tamaño o en la concentración de partículas entre las vesículas de la fase aguda y las de la basal (**Figura 47D-E**).

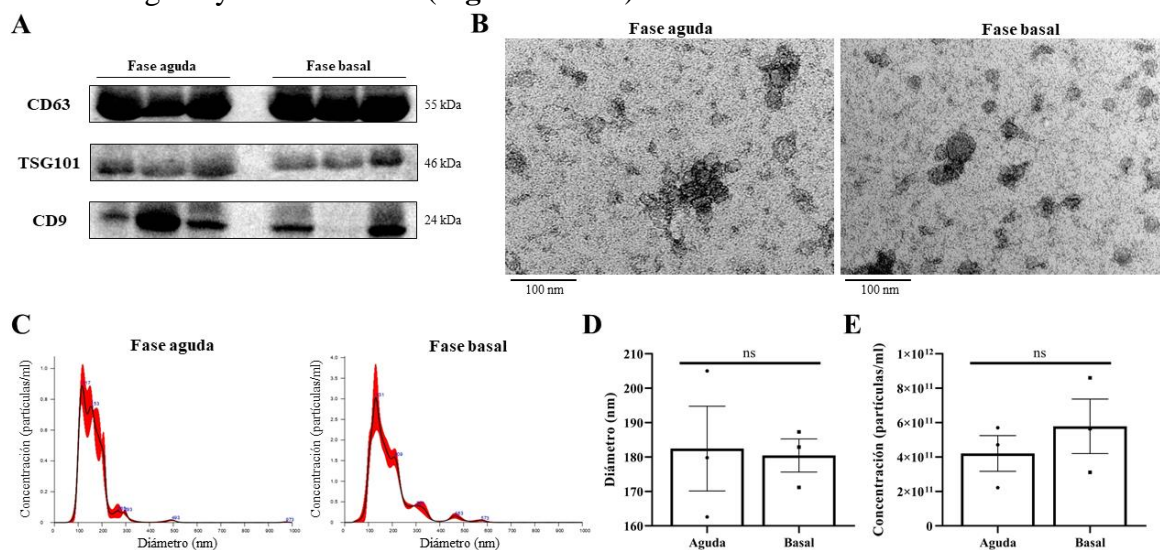


Figura 47. Caracterización de las VEs purificadas a partir de suero de niños con anafilaxia por alimentos. (A) Inmunodetección de marcadores específicos (CD63, TSG101 y CD9) de las VEs (N: 3). kDa: kilodalton. (B) Imágenes de microscopía electrónica de las VEs purificadas a partir de suero de la fase aguda y basal. (C) Diagrama del tamaño y de la concentración de partículas en las muestras analizadas por NTA de un paciente representativo. Comparación del (D) tamaño y de la (E) concentración entre las VEs de la fase aguda y basal (N: 3). ns: no significativo.

5.3.7. Los niveles del miR-21-3p aumentan en las vesículas extracelulares de niños con anafilaxia por alimentos durante la fase aguda de la reacción

Una vez purificadas y caracterizadas las VEs, se determinaron los niveles de miARNs de su interior en 15 niños con anafilaxia por alimentos. Sin embargo, 3 de ellos se descartaron del estudio debido a la hemólisis presente en sus muestras (**Figura 48A**). Tras esto, se corroboró la correcta extracción y RT de los miARNs contenidos en las vesículas de los 12 pacientes restantes (**Figura 48B-C**).

RESULTADOS

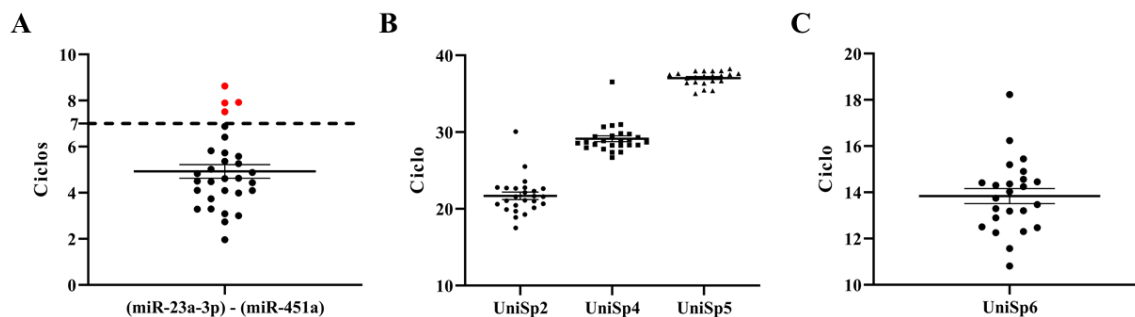


Figura 48. Controles del estudio de los miARNs en las VEs de la población pediátrica. (A) La calidad de las muestras se evaluó mediante el coeficiente entre el miR-23a-3p y el miR-451a. Las muestras hemolizadas (≥ 7 ciclos) se indican en rojo. (B) La calidad de la extracción de los miARNs de las VEs se verificó a través del uso de los controles exógenos UniSp2, UniSp4 y UniSp5. (C) El correcto desarrollo de la RT se confirmó mediante la medida del UniSp6.

Confirmada la calidad de las muestras y el correcto desarrollo de las técnicas, se midieron los valores del miR-21-3p y del miR-487b-3p en las VEs de los niños con anafilaxia por alimentos. En el caso del miR-21-3p, sus niveles aumentaron en las vesículas de la fase aguda respecto a aquellas de la basal, de acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de sus valores séricos y tras el contacto con las CE (Figura 49A). Sin embargo, no se encontró ningún cambio significativo en los niveles vesiculares del miR-487b-3p entre ambas condiciones (Figura 49B).

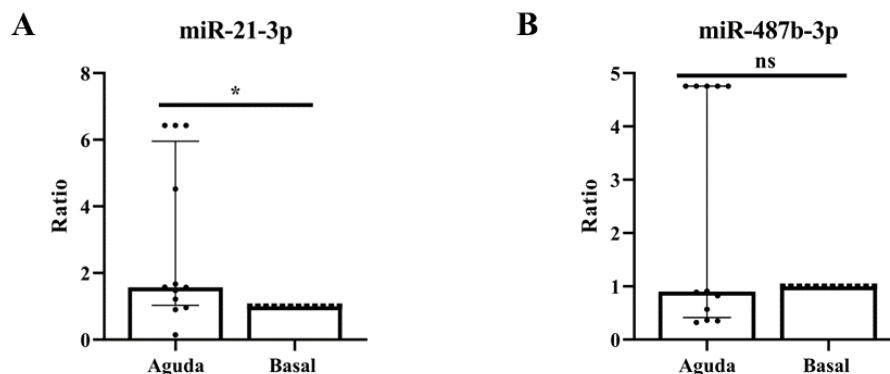


Figura 49. Determinación de los niveles del miR-21-3p y del miR-487b-3p en las VEs de 12 pacientes pediátricos con anafilaxia por alimentos. Cuantificación de los niveles (ratio agudo/basal) del (A) miR-21-3p (*p: 0,0269) y del (B) miR-487b-3p en las VEs purificadas a partir de suero de la fase aguda y basal.

5.4. Estudio de los niveles del miR-375-3p en los pacientes con anafilaxia

5.4.1. Pacientes con anafilaxia incluidos en el estudio de lo microARNs

El análisis de los miARNs se llevó a cabo en 176 muestras séricas pareadas obtenidas a partir de 88 pacientes con anafilaxia. A su vez, estos se dividían en 47 adultos con reacciones por medicamentos, 22 adultos con reacciones por alimentos y 19 niños con reacciones por alimentos. Sin embargo, 21 de ellos se descartaron del estudio debido a la hemólisis presente en sus muestras. Por lo tanto, la cohorte final incluyó 67 pacientes con anafilaxia (**Tabla 13**).

Esta población oscilaba entre los 4 y 76 años y más de la mitad eran mujeres. En cuanto a los síntomas clínicos, los más comunes fueron los cutáneos y los respiratorios, seguidos de los gastrointestinales, de los de las mucosas, de los cardiovasculares y, por último, de los nerviosos. A su vez, dos tercios de las reacciones se clasificaron como moderadas (Grado 2), mientras que las restantes se catalogaron como graves (Grado 3). No obstante, la frecuencia de los casos de Grado 3 fue menor en los niños con anafilaxia por alimentos (11%).

Por otra parte, la mayoría de las muestras agudas se obtuvieron después de la administración del tratamiento. En estos casos, el medicamento más utilizado fue la adrenalina, seguido de los corticoides, los antihistamínicos y, por último, los agonistas de los receptores adrenérgicos β_2 .

	Pacientes				p valor		
	Total	AM	AA	NA	AM vs AA	AM vs NA	AA vs NA
Número	67	35	13	19			
Género (mujeres)	60%	63%	54%	58%	0,5801	0,7270	0,8276
Edad (años) \pm SEM	27,9 \pm 2,3	44,6 \pm 2,4	33,3 \pm 3,2	10,5 \pm 0,9	0,0104*	0,0001*	0,0001*
Desencadenante							
Medicamentos	52%	100%	0%	0%	0,0001*	0,0001*	>0,9999
Alimentos	48%	0%	100%	100%	0,0001*	0,0001*	>0,9999
Síntomas							
Piel	88%	91%	92%	68%	0,9240	0,0305*	0,1155
Mucosa	49%	40%	77%	47%	0,0228*	0,6091	0,1005
Digestivo	61%	54%	85%	58%	0,0554	0,8034	0,1164
Respiratorio	88%	89%	77%	95%	0,3199	0,4649	0,1434
Neurológico	21%	34%	0%	11%	0,0142*	0,0587	0,2405
Cardiovascular	36%	40%	46%	21%	0,7081	0,1644	0,1412
Gravedad							
Grado 2	66%	57%	54%	89%	0,8421	0,0140*	0,0218*
Grado 3	34%	43%	46%	11%	0,8421	0,0140*	0,0218*
Tratamiento§							
Adrenalina	72%	80%	77%	53%	0,8203	0,0359*	0,1739
Antagonista de H1R	79%	82%	60%	90%	0,1660	0,5710	0,1346
Antagonista de H2R	71%	68%	70%	80%	0,9037	0,4808	0,6278
Corticoesteroides	21%	21%	30%	10%	0,5961	0,4373	0,2878
Agonista de β_2A	73%	79%	80%	50%	0,9267	0,0917	0,1769
	17%	14%	10%	30%	0,7392	0,2836	0,2878

Tabla 13. Características clínicas de los 67 pacientes con anafilaxia utilizados para el estudio de los miARNs. AM: adultos con anafilaxia por medicamentos, AA: adultos con anafilaxia por alimentos, NA: niños con anafilaxia por alimentos. § Porcentaje de pacientes tratados antes de la obtención de la muestra aguda. En el resto de los sujetos se administró la medicación después de recoger la muestra aguda. H1R: receptor 1 de la histamina, H2R: receptor 2 de la histamina, β_2A : receptores adrenérgicos β_2 .

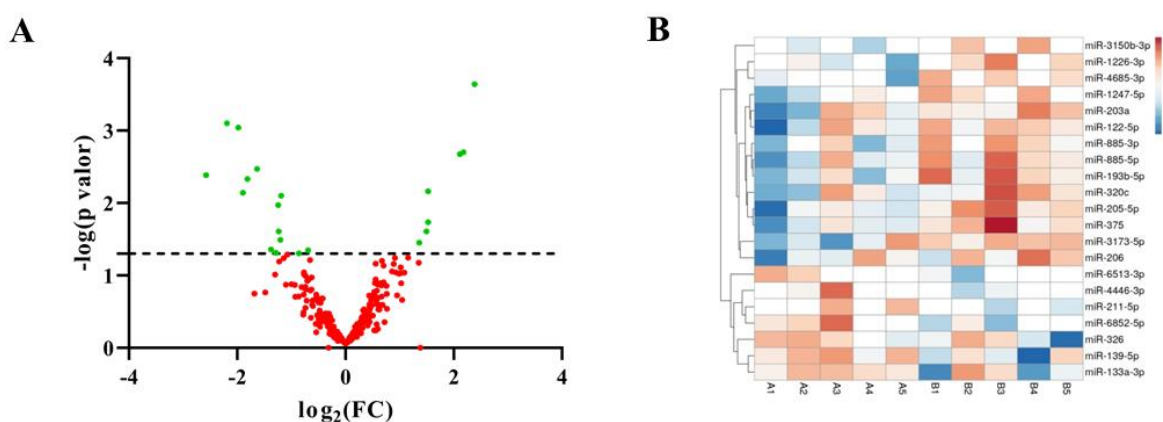
5.4.2. Identificación del perfil de microARNs séricos circulantes en adultos con anafilaxia inducida por fármacos

La caracterización del perfil de miARNs séricos circulantes en los adultos con anafilaxia por medicamentos se llevó a cabo mediante NGS, al igual que en el caso de los niños con reacciones por alimentos. Para ello, se utilizaron las muestras agudas y basales de tres pacientes de Grado 3 y dos de Grado 2. Además, el correcto desarrollo de la técnica se confirmó a través de diferentes controles de calidad (**Anexo V**).

En total se identificaron 334 miARNs (**Anexo VI**). Sin embargo, tras el análisis estadístico, sólo 21 de ellos mostraron diferencias significativas entre ambas condiciones (**Tabla 14** y **Figura 50A**). Los niveles de estos miARNs en cada muestra se representan mediante un mapa de calor en la **Figura 50B**. Entre ellos, 7 aumentaron durante la fase aguda, mientras que los 14 restantes disminuyeron (**Figura 50C**). A su vez, la similitud entre las réplicas biológicas y la correcta separación entre la condición aguda y basal se verificó mediante el PCA (**Figura 50D**).

miARN	Secuencia	log ₂ (FC)	p valor	FDR
miR-211-5p	UCCCCUUGUCAUCCUUCGCCU	2,386	0,000	0,000
miR-6513-3p	UCAAGUGUCAUCUGCCCUAG	2,179	0,002	0,000
miR-4446-3p	CAGGGCUGGCAGUGACAUGGGU	2,115	0,002	0,000
miR-6852-5p	CCCUGGGGUUCUGAGGACAUG	1,528	0,018	0,308
miR-139-5p	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAGU	1,526	0,007	0,091
miR-133a-3p	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG	1,496	0,025	0,400
miR-326	CCUCUGGGCCCUUCCUCCAG	1,364	0,035	0,529
miR-320c	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU	-0,693	0,045	0,579
miR-1226-3p	UCACCAGCCCUGUGUCCCUAG	-0,860	0,050	0,613
miR-205-5p	UCCUUAUCCACCGGAGUCUG	-1,187	0,008	0,091
miR-885-5p	UCCAUUACACUACCCUGCCUCU	-1,203	0,032	0,500
miR-3173-5p	UGCCUGCCUGUUUUCUCCUUU	-1,235	0,025	0,400
miR-206	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG	-1,240	0,011	0,167
miR-203a	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG	-1,283	0,049	0,613
miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	-1,377	0,044	0,579
miR-375-3p	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	-1,631	0,003	0,000
miR-1247-5p	ACCCGUCCCGUUCGUCCCCGGA	-1,809	0,005	0,091
miR-193b-5p	CGGGGUUUUGAGGGCGAGAUGA	-1,896	0,007	0,091
miR-3150b-3p	UGAGGAGAUCGUCGAGGUUGG	-1,979	0,001	0,000
miR-4685-3p	UCUCCUUCUGCCUCCUGGCUAG	-2,189	0,001	0,000
miR-885-3p	AGGCAGCGGGGUGUAGUGGAUA	-2,574	0,004	0,091

Tabla 14. Panel de los 21 miARNs estadísticamente significativos entre la fase aguda y basal de los adultos con anafilaxia por medicamentos. FC: tasa de cambio. FDR: tasa de error. En **negrita** se indican los miARNs seleccionadas para su validación en una cohorte mayor de pacientes.



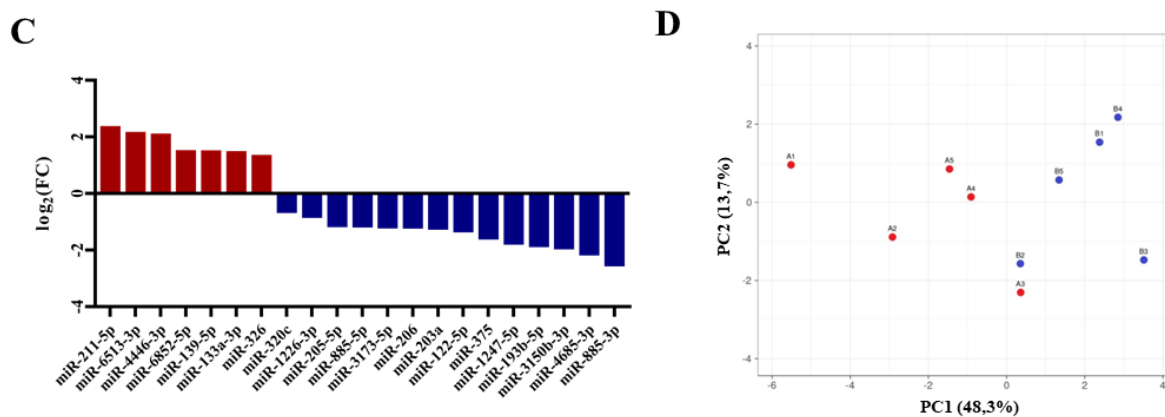


Figura 50. Perfil de miARNs séricos circulantes en adultos con anafilaxia por medicamentos. A: muestras de la fase aguda, B: muestras de la fase basal. (A) Dispersión de todos los miARNs identificados por NGS. Entre ellos, los 21 estadísticamente significativos se indican en verde ($p < 0,05$). (B) Representación gráfica de los niveles de los miARNs estadísticamente significativos en cada muestra. Las unidades del mapa de calor indican los datos de abundancia transformados (\log_2) y normalizados (método *Cyclic Loess*). En rojo se señala el aumento y en azul la disminución. (C) Distribución en función de su FC de los 7 miARNs aumentados (rojo) y de los 14 disminuidos (azul) en la fase aguda respecto a la basal. (D) PCA donde se representa la similitud entre las réplicas biológicas y la separación entre la condición aguda (puntos rojos) y basal (puntos azules). PC: componente principal.

Por otra parte, mediante una revisión bibliográfica realizada en Pubmed, se observó que la mitad (52%) de los miARNs significativos identificados se habían descrito previamente en otras condiciones alérgicas. Sin embargo, ninguno de ellos había sido relacionado con la anafilaxia (Tabla 15).

miARN	Condición alérgica	miARN	Condición alérgica
miR-211-5p	As ²⁵⁴	miR-6513-3p	
miR-4446-3p		miR-139-5p	As, DA ²⁵⁵⁻²⁵⁸
miR-6852-5p		miR-133a-3p	As ²⁵⁹⁻²⁶²
miR-326	As ²⁴⁷	miR-320c	As ^{263,264}
miR-1226-3p		miR-205-5p	Rn ^{265,266}
miR-885-5p		miR-3173-5p	
miR-206	As, IA, Rn ^{180,267-273}	miR-203a	As ^{274,275}
miR-122-5p	As ²⁷⁶	miR-375-3p	As, DA, IA, EoE, Rn ^{231,235,277-285}
miR-1247-5p		miR-193b-5p	
miR-3150b-3p		miR-4685-3p	
miR-885-3p	As ²⁸⁶		

Tabla 15. Búsqueda bibliográfica en Pubmed de los antecedentes en el campo de la alergia de los 21 miARNs significativos entre ambas fases. As: asma, DA: dermatitis atópica, Rn: rinitis, IA: inflamación alérgica, EoE: esofagitis eosinofílica. En **negrita** se indican los miARNs seleccionadas para su validación en una cohorte mayor de pacientes.

5.4.3. Los niveles séricos del miR-375-3p disminuyen durante la fase aguda de la reacción en los pacientes con anafilaxia

Para confirmar los resultados obtenidos por NGS se amplió el análisis de los miARNs séricos circulantes a 67 pacientes con anafilaxia adicionales (34 adultos con reacciones por medicamentos, 14 adultos con reacciones por alimentos, y 19 niños con reacciones por alimentos). Sin embargo, 15 de ellos fueron descartados del estudio debido a la hemólisis (≥ 7 ciclos) presente en alguna de sus muestras (Figura 51A). Por lo tanto, la cohorte final evaluada comprendió 52 pacientes con anafilaxia. En todos ellos se confirmó la correcta extracción del ARN sérico mediante la detección escalonada (5-7 ciclos) de los UniSp2, UniSp4 y UniSp5 (Figura 51B). Además, el UniSp6 se amplificó alrededor del ciclo 18 demostrando que la RT se había realizado adecuadamente (Figura 51C).

RESULTADOS

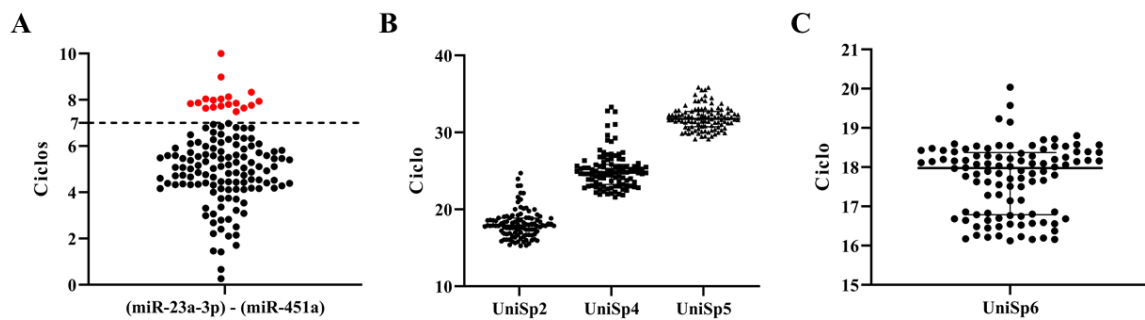


Figura 51. Controles del estudio de los miARNs séricos circulantes. (A) La hemólisis de las muestras se evaluó mediante el coeficiente entre el miR-23a-3p y el miR-451a. (B) La calidad de la extracción del ARN se verificó a través del uso de los controles exógenos UniSp2, UniSp4 y UniSp5. (C) El correcto desarrollo de la RT se confirmó mediante la medida del control exógeno de la técnica, el UniSp6.

Una vez confirmada la calidad de las muestras y el correcto desarrollo de las técnicas, se seleccionaron 6 de los miARNs identificados por NGS (miR-211-5p, miR-139-5p, miR-133a-3p, miR-375-3p, miR-193b-5p, miR-885-3p) para validar sus niveles séricos en una cohorte independiente de 23 adultos con anafilaxia por medicamentos. Los resultados obtenidos revelaron una reducción significativa de los valores del miR-375-3p durante la fase aguda respecto a la basal, de acuerdo con los datos obtenidos por NGS (FC: -1,63) (**Figura 52A**). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles del miR-139-5p, del miR-133a-3p o del miR-885-3p entre ambas condiciones. Además, el miR-211-5p y el miR-139-5p no se detectaron mediante qPCR en las muestras séricas de los pacientes con anafilaxia (**Figura 52B**). Por otra parte, también se midieron los valores de los miARNs identificados en la población pediátrica, el miR-21-3p y el miR-487b-3p. No obstante, tampoco se observaron cambios entre la fase aguda y la basal en los adultos con reacciones por medicamentos (**Figura 52C**).

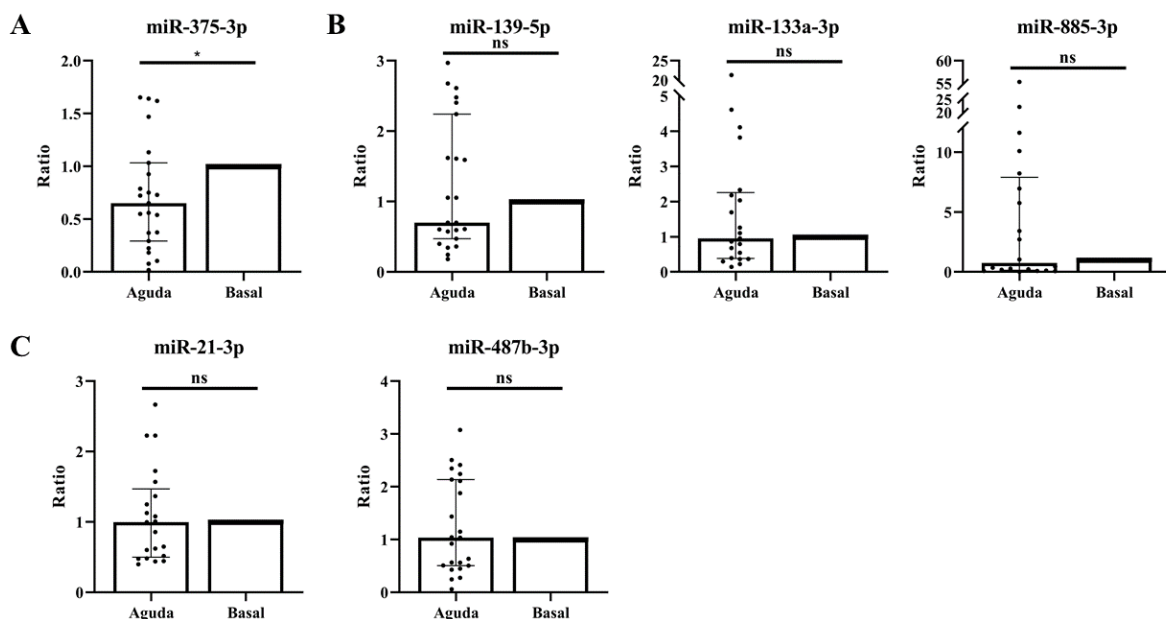


Figura 52. Determinación de los niveles de miARNs séricos circulantes en 23 pacientes adultos con anafilaxia por medicamentos. Niveles (ratio agudo/basal) (A) del miR-375-3p (*p: 0,0196; N: 23), (B) miR-139-5p (p: 0,4961; N: 23), miR-133a-3p (p: 0,3377; N: 21), miR-885-3p (p: 0,1429; N: 20), (C) miR-21-3p (p: 0,9652; N: 21) y miR-487b-3p (p: 0,3604; N: 23). El miR-211-5p y el miR-139-5p no se detectaron mediante qPCR en las muestras séricas de los pacientes con anafilaxia. ns: no significativo.

A su vez, para determinar el posible valor del miR-375-3p como biomarcador de anafilaxia, se amplió su estudio a dos nuevas cohortes de pacientes con reacciones por alimentos, una de 10 adultos y otra de 19 niños. En ambas poblaciones se observó una reducción

RESULTADOS

significativa de los niveles de este miARN durante la fase aguda respecto a la basal, al igual que ocurría en los adultos con reacciones por medicamentos (**Figura 53A-B**). Por lo tanto, el miR-375-3p desciende en todos los pacientes con anafilaxia (**Figura 53C**).

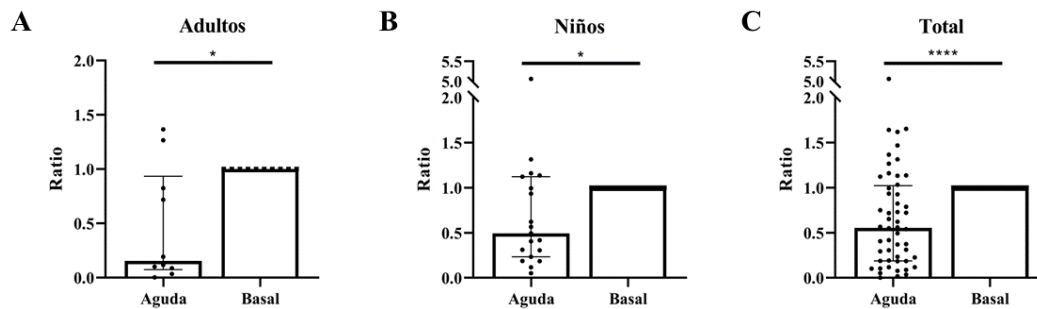


Figura 53. Determinación de los niveles del miR-375-3p en los 10 adultos y 19 niños con anafilaxia por alimentos. Cuantificación de los niveles (ratio agudo/basal) del miR-375-3p en (A) adultos (*p: 0,0273) y (B) niños (*p: 0,0181) con anafilaxia mediada por alimentos. (C) Niveles (ratio agudo/basal) del miR-375-3p en el total de pacientes (N: 52) con anafilaxia (****p: <0,0001).

5.4.4. Caracterización de las vesículas extracelulares purificadas a partir de suero de pacientes con anafilaxia

Debido a que gran parte de los miARNs circulantes se encuentran contenidos en las VEs se evaluaron los niveles del miR-375-3p dentro de estas partículas. Para ello, se purificaron las vesículas a partir de las muestras séricas de varios pacientes con anafilaxia y se caracterizaron utilizando diferentes técnicas.

Al igual que para el análisis de las VEs en la población pediátrica, el correcto aislamiento de estas vesículas se confirmó mediante la inmunodetección de las proteínas CD9, CD63, y TSG101 (**Figura 54A**). Además, las imágenes de microscopía electrónica y el NTA revelaron poblaciones heterogéneas de partículas (**Figura 54B-C**). No obstante, no se observaron diferencias en el tamaño o la concentración entre las VEs purificadas a partir de la muestra aguda y aquellas obtenidas de la basal (**Figura 54D-E**).

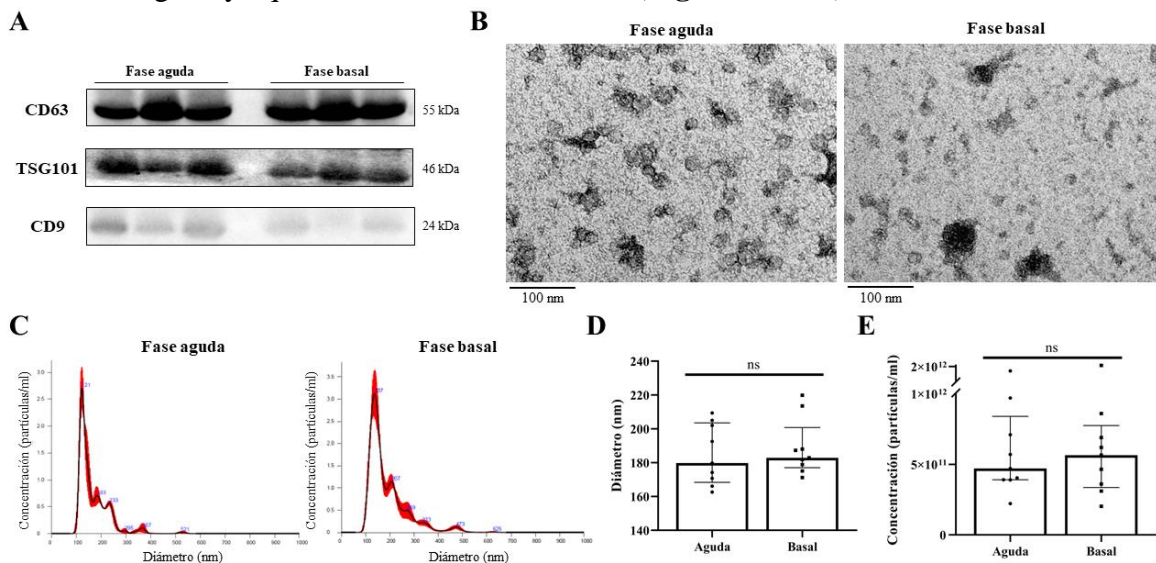


Figura 54. Caracterización de las VEs purificadas a partir de suero de pacientes con anafilaxia. Las VEs se purificaron a partir de las muestras séricas de 3 adultos con reacciones por medicamentos, 3 adultos con reacciones por alimentos y 3 niños con reacciones por alimentos (A) Detección de marcadores específicos (CD63, TSG101 y CD9) en las VEs de la fase aguda y basal de los 3 pacientes adultos con anafilaxia por medicamentos. kDa: kilodalton. (B) Imágenes de microscopía electrónica de las VEs purificadas a partir de suero de la fase aguda y basal. (C) Diagrama del tamaño y de la concentración de partículas en las muestras de un paciente adulto con anafilaxia por medicamentos. Comparación del (D) tamaño y de la (E) concentración entre las VEs de la fase aguda y basal (N: 9).

5.4.5. Los niveles del miR-375-3p disminuyen en las vesículas extracelulares purificadas a partir de suero de la fase aguda de la anafilaxia

Los niveles de miARNs se midieron en las VEs de 53 pacientes con anafilaxia (19 adultos con reacciones por medicamentos, 19 adultos con reacciones por alimentos y 15 niños con reacciones por alimentos). Sin embargo, al evaluar el coeficiente entre el miR-23a-3p y el miR-451a, 18 de ellos fueron descartados del estudio debido a la hemólisis presente en sus muestras (**Figura 55A**). En consecuencia, el análisis final se llevó a cabo en las VEs purificadas a partir de suero de 35 pacientes con anafilaxia. No obstante, primero se confirmó la correcta extracción y RT de los miARNs contenidos su interior (**Figura 55B-C**).

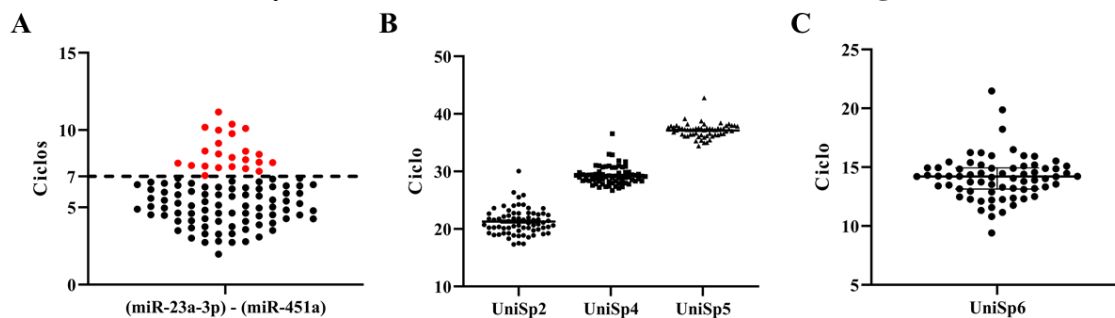


Figura 55. Controles del estudio de los miARNs en las VEs de los pacientes con anafilaxia. (A) La calidad de las muestras se evaluó mediante el coeficiente entre el miR-23a-3p y el miR-451a. Las muestras hemolizadas (≥ 7 ciclos) se indican en rojo. (B) La calidad de la extracción de los miARNs de las VEs se verificó a través del uso de los controles exógenos UniSp2, UniSp4 y UniSp5. (C) El correcto desarrollo de la RT se confirmó mediante la medida del UniSp6.

Tras evaluar la calidad de las muestras y las técnicas, se determinaron los niveles del miR-375-3p. Los resultados obtenidos demostraron una disminución de sus valores en las VEs de la fase aguda en comparación con las de la basal, al igual que lo observado en suero (**Figura 56A**). A su vez, el análisis llevado a cabo de forma independiente en cada grupo de pacientes reveló una reducción de los niveles de este miARN en los adultos con anafilaxia por medicamentos y en los niños con anafilaxia por alimentos (**Figura 56B**).

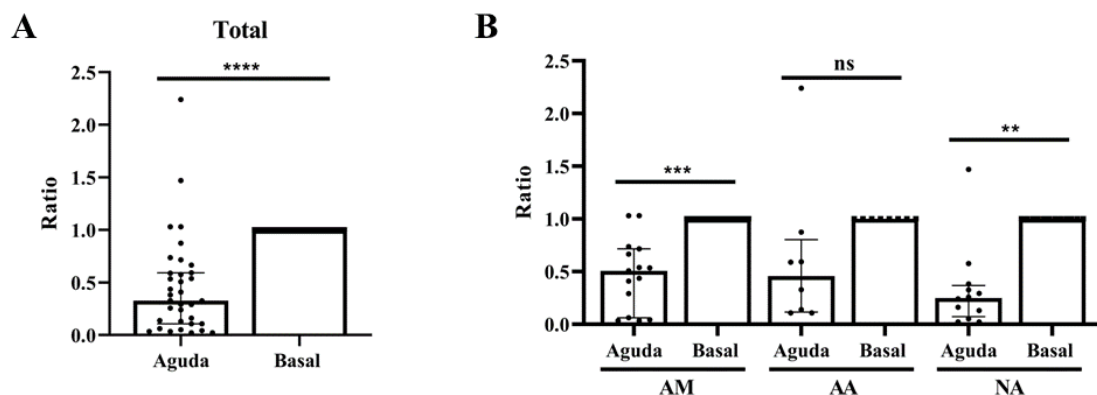


Figura 56. Determinación de los niveles del miR-375-3p en las VEs de los pacientes con anafilaxia. (A) Comparación de los niveles (ratio agudo/basal) del miR-375-3p (*p: 0,0269) entre las VEs purificadas a partir de la fase aguda y aquellas obtenidas de la basal en el total de pacientes con anafilaxia (N: 35). (B) Estratificación de los valores del miR-375-3p entre los adultos con reacciones por medicamentos (**p: 0,0003; N: 15), los adultos con reacciones por alimentos (p: 0,1875; N: 8) y los niños con reacciones por alimentos (**p: 0,0015; N: 12). AM: adultos con reacciones por medicamentos, AA: adultos con reacciones por alimentos, NA: niños con reacciones por alimentos.

5.4.6. Análisis de biología de sistemas del miR-375-3p

Para dilucidar el posible efecto en los mecanismos moleculares de la reacción de la reducción de los niveles del miR-375-3p en suero y en las VEs, se realizó un IPA con sus 269 genes diana. El SBA indicó varias enfermedades y trastornos estrechamente relacionados con la fisiopatología de la anafilaxia, como las enfermedades dermatológicas y gastrointestinales.

RESULTADOS

Además, entre las vías de señalización canónicas reguladas por el miR-375-3p, se encontraron varios procesos asociados con este evento patológico como la señalización de la PI3K/Akt, de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y del AMPc (**Tabla 16**).

Principales enfermedades y trastornos	Rango del p valor
Cáncer	1,94e-03 - 3,74e-23
Lesiones y anomalías del organismo	2,15e-03 - 3,74e-23
Enfermedades gastrointestinales	1,25e-03 - 2,92e-20
Enfermedades y afecciones dermatológicas	1,82e-04 - 5,44e-14
Enfermedades del sistema endocrino	1,64e-03 - 1,41e-12

Vías de señalización canónicas	-log(p valor)
Señalización del IGF-1	3,74
Señalización de prolactina	2,53
Señalización por Wnt/ β -catenina	2,44
Vía de la ubiquitinación de proteínas	2,37
Vía STAT3	2,35
Mecanismos moleculares del cáncer	2,30
Función de JAK2 en la señalización de citoquinas de tipo hormonal	2,18
Señalización por PI3K/Akt	2,11
Papel de NANOG en la pluripotencia de las células madre embrionarias de mamíferos	1,93
<i>Splicing</i> de ARNt	1,87
Señalización por GPCR	1,86
Vía de señalización de la ferroptosis	1,84
Señalización del PEDF	1,82
Señalización mediada por el AMPc	1,80
Regulación de la señalización de eIF4 y p70S6K	1,78
Regulación del desarrollo de la vía de transición epitelio-mesénquima	1,77
Vía mitocondrial de transporte de L-carnitina	1,76
Regulación de la mecánica celular por la proteasa calpaína	1,73
Señalización de respuesta de fase aguda	1,72
Señalización de Rac	1,69

Tabla 16. IPA del miR-375-3p. “Principales enfermedades y trastornos” y “vías señalización canónicas” más significativas para los 269 genes diana del miR-375-3p. IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1, STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3, ARNt: ARN de transferencia, PEDF: factor derivado del epitelio pigmentario, eIF4: factor de iniciación eucariota 4F, p70S6K: proteína ribosómica S6 quinasa β -1.

5.4.7. El miR-375-3p bloquea parcialmente el efecto estabilizador del AMPc en la barrera endotelial

De acuerdo con los resultados obtenidos en el SBA, se decidió estudiar la función del miR-375-3p en la señalización del AMPc, uno de los principales mediadores implicados en la estabilización del endotelio y en la homeostasis vascular durante la anafilaxia⁶⁴. Para ello, en primer lugar, se transfectaron las HMVEC-D y se evaluó el correcto funcionamiento de la técnica mediante qPCR y tinciones de inmunofluorescencia. Sin embargo, no se pudo evaluar el efecto del inhibidor del miR-375-3p ya que no se observaron células tras su transfección (**Figura 57A-B**). Por lo tanto, se llevó a cabo un experimento con dosis decrecientes de esta molécula, el cual reveló la ausencia completa de CEs en cantidades superiores a 0,5 mM y un deterioro sustancial de la monocapa endotelial en las dosis de 0,5 y 0,1 mM (**Figura 57C**).

RESULTADOS

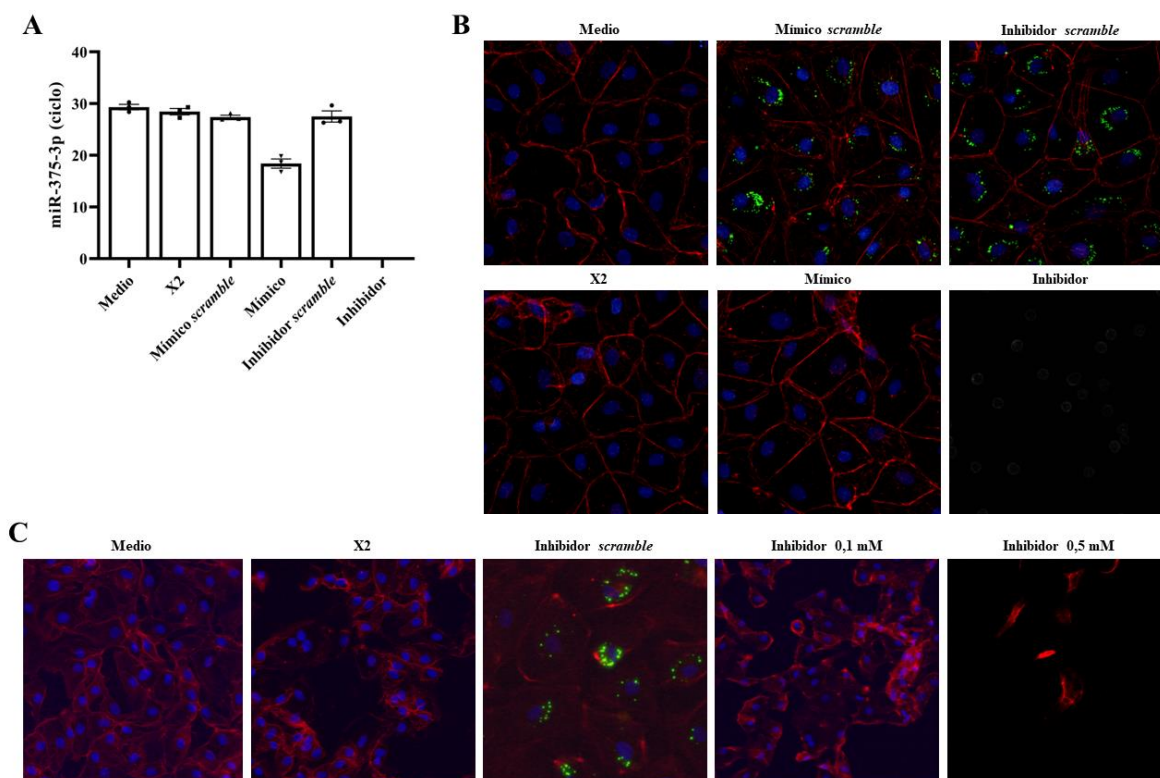
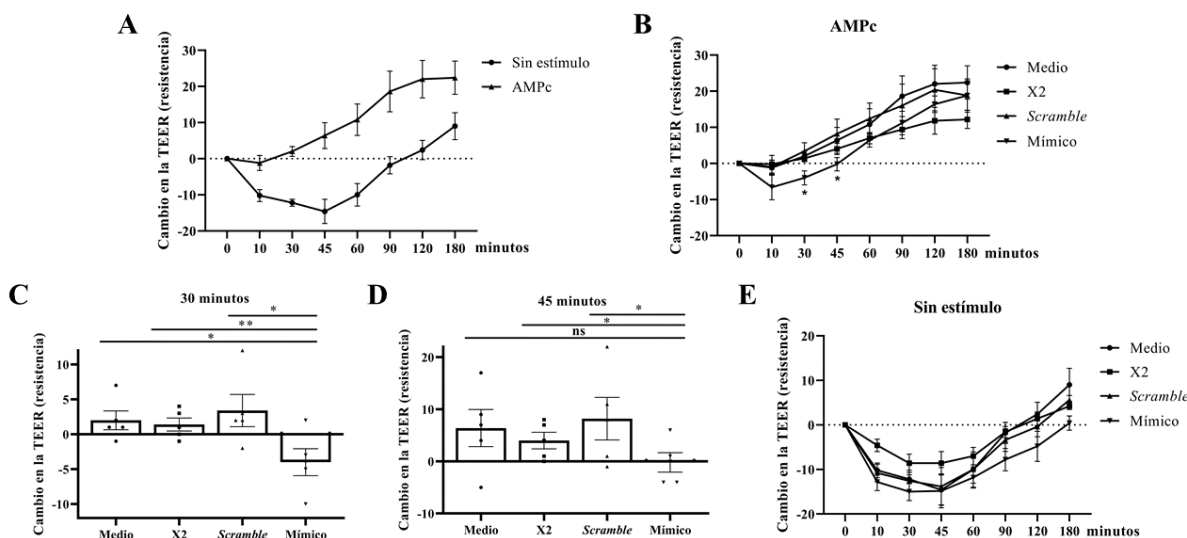


Figura 57. Evaluación de la transfección de las HMVEC-D. (A) Determinación de los niveles intracelulares del miR-375-3p por qPCR tras la transfección de las células (50 mM). X2: vehículo de transfección. (B) Inmunofluorescencia de las HMVEC-D transfectadas. En rojo (*Texas-Red*) se visualizan los filamentos de actina, en azul (DAPI) los núcleos y en verde los miARNs controles fluorescentes (*scramble*). (C) Estudio de la monocapa endotelial tras la transfección con concentraciones decrecientes (50 - 0,1 mM) del inhibidor del miR-375-3p. Las imágenes de las CE transfectadas con dosis superiores a 0,5 mM no se muestran debido a la ausencia total de células.

Una vez confirmada la transfección del mimico del miR-375-3p, se verificó el efecto del AMPc como estabilizador de la monocapa endotelial. Precisamente, este mediador indujo un aumento de los valores de la TEER en comparación con las HMVEC-D sin estimular (**Figura 5A**). Sin embargo, las células transfectadas con el miR-375-3p tardaron más en responder al efecto ejercido por el AMPc (**Figura 5B**). En concreto, los niveles de la TEER fueron significativamente menores a los 30 y 45 minutos en las células transfectadas con el mimico respecto a los controles (**Figura 5C-D**). Además, no se observaron diferencias en las células transfectadas con el miR-375-3p cuando no se estimularon con el AMPc (**Figura 5E**).



RESULTADOS

Figura 58. El miR-375-3p bloquea parcialmente la respuesta a AMPc. (A) Cambios en la TEER de la monocapa de CEs sin transfectar tras la incubación con AMPc (N: 5). (B) Medidas de la TEER en HMVEC-D transfectadas con el miR-375-3p y estimuladas con AMPc (N: 5). X2: vehículo de transfección. Las diferencias significativas se observan a los (C) 30 y (D) 45 minutos. Mímico vs Medio a los 30 minutos (*p: 0,0144), Mímico vs X2 a los 30 minutos (**p: 0,0090) y Mímico vs *Scramble* a los 30 minutos (*p: 0,0215); Mímico vs X2 a los 45 minutos (*p: 0,0167) y Mímico vs *Scramble* a los 45 minutos (*p: 0,0388). ns: no significativo. (E) Medida de la TEER en las HMVEC-D transfectadas con el miR-375-3p sin estimular con AMPc (N: 5).



6. DISCUSIÓN

La anafilaxia es la manifestación más grave de los trastornos alérgicos. Estas reacciones presentan unas características muy heterogéneas, por lo que el enfoque de sus planteamientos clínicos está evolucionando hacia una medicina personalizada y de precisión³. En consecuencia, todos los análisis realizados en esta tesis se llevaron a cabo de forma pareada a partir de la sangre periférica obtenida durante la fase aguda y basal de los pacientes con anafilaxia.

En las últimas décadas, la incidencia y la prevalencia de este evento patológico han ido en aumento²⁸⁷⁻²⁸⁹. Sin embargo, se considera que estos datos están subestimados debido a la falta de biomarcadores eficaces y a la ambigüedad del diagnóstico de la reacción¹. Precisamente, este se lleva a cabo en base a los síntomas clínicos de los pacientes, los cuales son comunes a muchas otras patologías^{3,14}. Por lo tanto, es necesario encontrar nuevos marcadores moleculares que sean más fiables, estables e identifiquen mejor los casos de anafilaxia.

En humanos, la reacción anafiláctica se produce principalmente por la activación de los mastocitos y los basófilos, los cuales liberan los mediadores que provocan los signos y síntomas de este evento patológico¹⁵. Entre ellos, las alteraciones cardiovasculares son las que determinan la aparición de los casos más graves⁶⁴. Precisamente, los agentes vasoactivos liberados durante la reacción provocan la ruptura de la barrera endotelial e inducen la consiguiente salida del contenido vascular causando hipotensión, un factor decisivo en el desarrollo del choque anafiláctico^{95,290}. Por lo tanto, comprender la fisiopatología cardiovascular de la anafilaxia es crucial para el desarrollo de estrategias terapéuticas eficaces⁶⁴.

No obstante, investigaciones recientes han descrito la existencia de otras células y vías de señalización implicadas en este evento patológico⁹⁵. Además, es probable que otras moléculas, aún inexploradas, contribuyan al desarrollo de la reacción^{64,291,292}. Durante los últimos años, la relevancia de las VEs y los miARNs en el campo de la alergia ha ido en aumento^{293,294}. Estos mediadores tienen un efecto pleiotrópico y participan en la regulación de una gran variedad de procesos, tanto fisiológicos como patológicos^{124,164}. Además, se han postulado como unos biomarcadores no invasivos prometedores de diferentes patologías^{135,163}. Sin embargo, nunca se habían estudiado durante la anafilaxia en humanos.

Por lo tanto, durante esta tesis, se caracterizaron las proteínas, las VEs y los miARNs circulantes en muestras de pacientes con anafilaxia y se evaluó su potencial como marcadores diagnósticos de este evento patológico. Además, se estudió su posible papel en las bases moleculares de la reacción mediante análisis *in silico* y se determinó su función en el sistema vascular a través de ensayos endoteliales *in vitro*.

6.1. Identificación de biomarcadores en anafilaxia

La naturaleza potencialmente mortal de la anafilaxia promueve un creciente interés por descubrir nuevos biomarcadores que ayuden a su diagnóstico y prevención. Sin embargo, tanto los síntomas como la etiopatogenia de estas reacciones son muy diversos, lo que dificulta la identificación de marcadores moleculares fiables²⁹⁵.

Actualmente, la determinación de los niveles de triptasa sérica es la principal prueba *in vitro* utilizada para confirmar el diagnóstico de la anafilaxia. Sin embargo, el uso de esta proteína como biomarcador presenta varios inconvenientes, ya que no se eleva en gran parte de los

casos⁴³. A su vez, tampoco se dispone de marcadores moleculares que nos permitan predecir este evento patológico, identificar las células implicadas, evaluar la posible respuesta al tratamiento o determinar el grado de afectación de los distintos órganos y/o sistemas²⁹⁵.

En consecuencia, durante esta tesis, se analizaron y caracterizaron diferentes moléculas propuestas como potenciales marcadores diagnósticos de otras patologías, pero aún inexploradas durante la anafilaxia en humanos. En concreto, se evaluaron las proteínas, las VEs y los miARNs circulantes en la sangre periférica de los pacientes. Los biomarcadores derivados de estas muestras presentan varias ventajas, ya que reflejan el estado del individuo, son fáciles de medir y se obtienen mediante métodos mínimamente invasivos²⁹⁶.

6.1.1. La medicina personalizada de los pacientes con anafilaxia mejora la capacidad diagnóstica de la triptasa sérica

Las determinaciones de la triptasa sérica en las muestras de los pacientes con anafilaxia revelaron un aumento de sus niveles de manera acorde a la gravedad de la reacción, de acuerdo con lo descrito previamente en otros estudios^{43,50,297}. Actualmente, el umbral diagnóstico de esta proteína solamente tiene en cuenta su valor agudo (11,4 µg/L)⁴⁵. Sin embargo, se ha visto que la consideración del estado basal de los pacientes mejora sustancialmente el reconocimiento de este evento patológico^{21,297}. Por lo tanto, se han sugerido dos nuevas aproximaciones que contemplan este parámetro (20% + 2 µg/L y 135%)^{47,48}.

La capacidad diagnóstica de la triptasa sérica se evaluó en cada uno de los umbrales propuestos, tanto en el que consideraba solamente el valor agudo como en aquellos que tenían en cuenta ambas condiciones. Los resultados obtenidos revelaron una mayor correlación entre los síntomas clínicos y el diagnóstico molecular cuando se aplicaban parámetros relativos a la medicina personalizada de los pacientes. Precisamente, más del doble de los casos de anafilaxia se clasificaron correctamente considerando el incremento del 135% durante la fase aguda respecto a la basal. Sin embargo, esta aproximación presentó una menor especificidad, ya que se elevó el número de falsos positivos. Por otra parte, cuando se tuvo en cuenta el aumento del 20% + 2 µg/L solo se diagnosticaron adecuadamente un tercio de las reacciones, pero no hubo ningún falso positivo. No obstante, ambas aproximaciones presentaron una mejor capacidad diagnóstica de este evento patológico respecto a la que consideraba únicamente el valor agudo, donde se clasificaron correctamente solo una quinta parte de los casos de anafilaxia.

Estos resultados confirmaron la importancia de realizar una medicina de precisión y personalizada de los pacientes. A su vez, demostraron la necesidad de encontrar nuevos y mejores biomarcadores que suplan o complementen a la triptasa sérica ya que, utilizando esta proteína, solo se diagnosticaron adecuadamente el 34-55% de las reacciones anafilácticas. Además, esto ocurrió principalmente en los casos más leves, donde la confirmación molecular es más necesaria.

6.1.2. Cuantificación indirecta de la extravasación subyacente a la anafilaxia en humanos

El aumento de la permeabilidad endotelial es una de las principales alteraciones fisiopatológicas subyacentes a la anafilaxia⁶⁴. Este proceso conduce a una fuga del contenido vascular hacia los tejidos que deriva en una reducción de la concentración sérica y en una

disminución inespecífica de todas las proteínas circulantes. Entre ellas destaca la ASH, ya que supone más del 50% del total de las proteínas presentes en el suero¹¹⁴. Por lo tanto, en esta tesis, se decidió evaluar la concentración de proteínas y los niveles de la ASH en las muestras séricas de los pacientes con anafilaxia. Los resultados obtenidos revelaron una disminución significativa de estos parámetros durante la fase aguda y de manera acorde a la gravedad de la reacción (**Figura 59**). Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que ambos factores se han estudiado en la anafilaxia en humanos. Sin embargo, la disminución de la concentración de proteínas séricas ya se ha propuesto como un posible indicador de otros cuadros agudos como la pancreatitis y la ascitis^{298,299}. A su vez, la reducción de los niveles de la ASH se ha relacionado con varios procesos patológicos como el estrés operatorio y la cirugía hepática^{300,301}. Por lo tanto, ambas medidas podrían mejorar y aumentar la precisión del diagnóstico de la anafilaxia. No obstante, todavía son necesarios más estudios en diferentes cohortes de pacientes con un mayor número de muestras para poder determinar la sensibilidad y especificidad de estos marcadores moleculares, tanto individualmente como en combinación con la triptasa sérica.

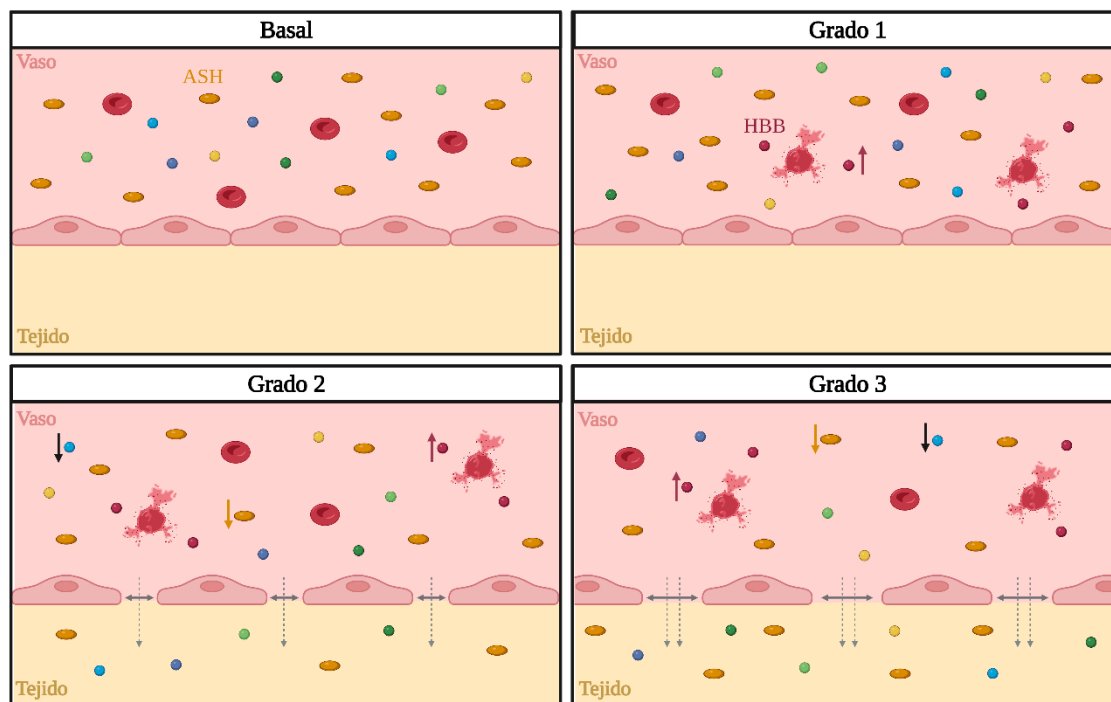


Figura 59. Representación gráfica de la extravasación de las proteínas séricas circulantes en las reacciones de hipersensibilidad y anafilaxia. La concentración de proteínas séricas y los niveles de la ASH disminuyen durante la anafilaxia (casos de Grado 2 y Grado 3) de manera acorde a la gravedad de la reacción. A su vez, la HBB aumenta en todos los pacientes con reacciones de hipersensibilidad.

Por otra parte, se observó un aumento de los niveles de la HBB en la fase aguda de los pacientes con anafilaxia (**Figura 59**). Esta proteína forma parte de la hemoglobina y se encuentra localizada dentro de los glóbulos rojos, por lo que sus valores séricos se elevan a causa de la hemólisis³⁰². Este proceso puede llevarse a cabo por la acción de varios factores, como el complemento y la coagulación³⁰³. Ambas cascadas están estrechamente relacionadas con la anafilaxia y se activan principalmente en los casos más graves^{83,295}. A su vez, se ha demostrado una liberación masiva de la hemoglobina de los glóbulos rojos durante las reacciones inflamatorias sistémicas³⁰³. Precisamente, la HBB se ha propuesto como marcador molecular para el diagnóstico de la sepsis³⁰⁴. Curiosamente, hasta la fecha, la única investigación que ha cuantificado la pérdida de fluidos durante la anafilaxia en humanos se

ha basado en las medidas de la hemoglobina⁹⁸. Sin embargo, la hemólisis también puede deberse a los protocolos de obtención, procesamiento y almacenamiento de las muestras, provocando alteraciones en sus medidas y restando valor al uso de esta proteína como biomarcador³⁰⁵. Los resultados obtenidos en esta tesis revelaron que los niveles de la HBB también aumentaban en los casos de hipersensibilidad leves y no variaban en función de la gravedad de la reacción, por lo que podrían haberse visto afectados por estos factores.

La mayoría de los datos disponibles acerca de la extravasación asociada a la anafilaxia se han obtenido a partir de modelos animales¹⁵. En concreto, técnicas como el ensayo de Miles se basan en la tinción de la albúmina sérica con el colorante azul de Evans, permitiendo visualizar y cuantificar la extravasación acontecida durante la reacción^{306,307}. Por lo tanto, el descenso de los niveles circulantes de la ASH permitiría medir indirectamente la extravasación acontecida en los pacientes con anafilaxia. Además, dado que la clasificación de las reacciones de hipersensibilidad y anafilácticas incluye una gran variedad de signos y síntomas en cada grado, se estratificaron los valores de esta proteína en función de los órganos y/o sistemas afectados individualmente en cada caso y se observó una clara reducción de sus valores en los eventos más graves. Estos hallazgos han permitido avanzar en la comprensión de la fisiopatología vascular de la anafilaxia humana después de muchos años. Sin embargo, aunque la recogida de muestras es ardua y complicada, son necesarios futuros estudios en una población mayor de pacientes para confirmarlos.

A su vez, los resultados obtenidos en relación con el descenso de la ASH plantean varias alternativas para el manejo clínico de este evento patológico. El tratamiento de la anafilaxia se basa principalmente en la inyección de adrenalina intramuscular, aunque también se utilizan otras terapias complementarias como la administración de cristaloides para corregir la pérdida de volumen circulante³. Sin embargo, nunca se ha intentado paliar la hipoalbuminemia subyacente a la reacción. Actualmente, varios ensayos clínicos discrepan sobre la eficacia de las terapias con ASH¹¹³. Sin embargo, un estudio realizado en 1818 sujetos con sepsis grave ha demostrado que la adición de esta proteína no mejora el tratamiento de la hipovolemia en comparación con los cristaloides, pero sí que ayuda a corregir las alteraciones hemodinámicas de los pacientes³⁰⁸. Estos beneficios se deben a las funciones de la ASH como antioxidante, antiinflamatoria y estabilizadora de la barrera endotelial³⁰⁹. Además, esta proteína actúa como bloqueante del NO, el principal mediador vasodilatador en la anafilaxia^{309,310}. Por lo tanto, la administración terapéutica de ASH se postula como una estrategia complementaria prometedora para este evento patológico, aunque son necesarios ensayos que confirmen su efectividad en la práctica clínica.

6.1.3. Nuevos biomarcadores en anafilaxia: vesículas extracelulares y microARNs

Las técnicas ómicas permiten realizar estudios a gran escala favoreciendo la identificación de biomarcadores³¹¹. Por ejemplo, el análisis del proteoma de las VEs de cáncer ha servido como fuente de marcadores moleculares para reconocer los estadios tempranos de estas patologías³¹².

Por lo tanto, el perfil proteico de las VEs de plasma se caracterizó mediante espectrometría de masas a partir de 5 grupos de pacientes adultos con anafilaxia por diferentes causas. A su vez, el análisis de los miARNs séricos circulantes se llevó a cabo por NGS, una herramienta transcriptómica clave para el descubrimiento de biomarcadores³¹³. Para ello, se utilizaron las muestras de 5 niños con anafilaxia por alimentos y de 5 adultos con reacciones por

medicamentos, ya que se tratan de los principales desencadenantes para estas franjas de edad^{3,4}. Los paneles de moléculas derivadas de estos estudios se muestran en la **Figura 60**.

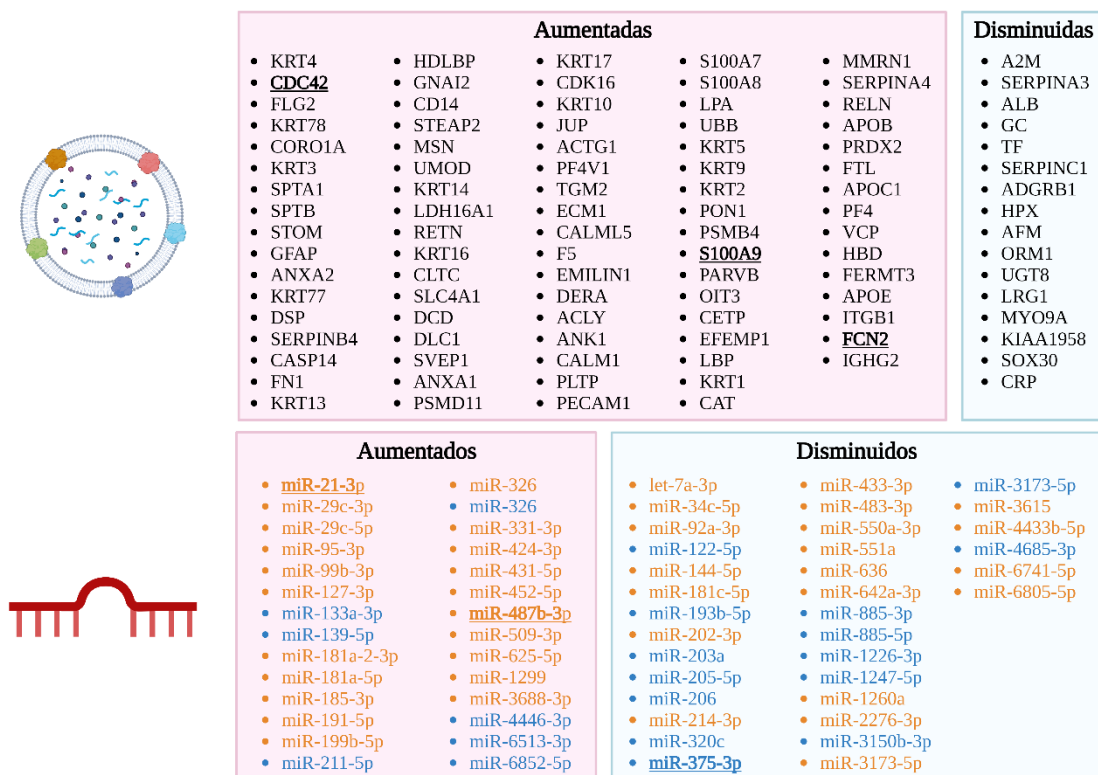


Figura 60. Resumen de las moléculas identificadas diferencialmente entre la fase aguda y basal de los pacientes con anafilaxia. En los paneles superiores se muestran las proteínas de las VEs de plasma, mientras que en los inferiores se representan los miARNs séricos circulantes. En naranja se indican los miARNs identificados en niños con anafilaxia por alimentos y en azul los determinados en adultos con reacciones por medicamentos. En **negrita** y subrayado se señalan los validados en una cohorte mayor de pacientes.

En el caso de la composición proteica de las VEs de plasma, se observó una clara diferencia entre las vesículas purificadas a partir de la fase aguda y aquellas obtenidas de la basal. El análisis de espectrometría de masas identificó 99 proteínas estadísticamente diferenciales entre ambas condiciones de acuerdo con unos criterios estrictos establecidos. En concreto, 83 de ellas se encontraron aumentadas y 16 disminuidas durante la reacción anafiláctica. A su vez, de acuerdo con la base de datos *Vesiclepedia*, el 98% ya habían sido descritas en las VEs. Además, un 23% se habían relacionado previamente con la anafilaxia. Por otra parte, el estudio de los miARNs séricos circulantes mediante NGS reveló 62 moléculas diferenciales, de las cuales 28 aumentaron durante la fase aguda, mientras que las 34 restantes disminuyeron. Sin embargo, solo el miR-181a se había asociado con la anafilaxia, aunque un 40% de los miARNs habían sido descritos previamente en otras patologías alérgicas.

A su vez, varias de las moléculas diferenciales entre ambas fases se seleccionaron para validar sus niveles en una cohorte mayor de pacientes. En primer lugar, las proteínas CDC42, Ficolina 2 y S100A9 se escogieron para confirmar la identificación masiva llevada a cabo previamente. El análisis realizado en un mayor número de muestras reveló un aumento de sus niveles en las VEs de la fase aguda respecto a las de la basal, de acuerdo con lo observado por espectrometría de masas (**Figura 61**). CDC42 se ha propuesto como biomarcador de la rinitis alérgica, ya que su aumento se correlaciona con los síntomas clínicos y los niveles de linfocitos Th2³¹⁴. A su vez, Ficolina 2 está asociada con el desarrollo de las enfermedades alérgicas en niños³¹⁵. En concreto, se ha visto que esta proteína induce la liberación de varios

mediadores inflamatorios como $IFN\gamma$, IL-6, $TNF\alpha$ y NO ³¹⁶. Curiosamente, algunas de estas moléculas han sido estudiadas como posibles marcadores diagnósticos de anafilaxia²⁹⁵. Por otra parte, los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas revelaron un aumento de los niveles de las alarminas S100A7, S100A8 y S100A9 en las VEs obtenidas durante la fase aguda. En relación, se ha descrito recientemente un incremento de los valores séricos de S100A8 y S100A9 en pacientes con anafilaxia²⁰⁶.

Por otra parte, entre los miARNs identificados mediante NGS en los niños con reacciones por alimentos, se seleccionaron seis para validar sus niveles en un mayor número de muestras. Sin embargo, solo se encontraron diferencias significativas en el miR-21-3p y el miR-487b-3p, los cuales aumentaban durante la fase aguda (**Figura 61**). No obstante, cuando se amplió su análisis a los adultos con reacciones por medicamentos no se observaron cambios entre ambas condiciones. Estos resultados podrían indicar un endotipo específico de anafilaxia en niños con reacciones por alimentos, postulándose como biomarcadores en la población pediátrica, aunque no pudiendo extrapolarse a otros casos. Precisamente, el incremento del miR-21-3p se ha propuesto como biomarcador de otras patologías alérgicas como el asma, la esofagitis eosinofílica, la rinitis y la dermatitis alérgica de contacto²²⁸⁻²³¹. Además, se ha utilizado para evaluar la respuesta al tratamiento en pacientes asmáticos²²⁷. A su vez, el análisis de los miARNs en los pulmones fibróticos reveló un aumento de los valores del miR-487b-3p³¹⁷. Sin embargo, los niveles de esta molécula disminuyeron en los pacientes con rinitis alérgica²³⁹.

Asimismo, al igual que en la población pediátrica, se seleccionaron seis de los miARNs identificados en adultos para evaluar sus niveles en una cohorte mayor e independiente de pacientes con reacciones por medicamentos. Sin embargo, aunque se encontró un comportamiento similar en alguna de las moléculas estudiadas, sólo se detectaron diferencias significativas en el caso del miR-375-3p, cuyos niveles disminuían durante la fase aguda (**Figura 61**). En consecuencia, para confirmar su posible uso como marcador diagnóstico de la anafilaxia, su análisis se amplió a otras dos nuevas cohortes de pacientes con reacciones por alimentos, una de niños y otra de adultos. Precisamente, los resultados obtenidos en estas poblaciones también revelaron una disminución del miR-375-3p durante la fase aguda. A su vez, el descenso de este miARN se ha descrito en otras enfermedades alérgicas como el asma, la rinitis y la esofagitis eosinofílica, donde se ha propuesto como biomarcador no invasivo^{231,278,282}.

Resulta relevante destacar un estudio llevado a cabo por Francuzik *et al.* en paralelo al desarrollo de esta tesis, donde se ha identificado un aumento de los niveles séricos del miR-451a en adultos con anafilaxia mediada por alimentos y veneno de himenópteros, proponiéndolo como biomarcador de este evento patológico³¹⁸. Sin embargo, este miARN también pueden elevarse como resultado de la hemólisis^{319,320}. Precisamente, todos los análisis realizados en esta tesis para determinar la calidad de las muestras se llevaron a cabo calculando la diferencia entre el miR-451a y el miR-23a-3p. Por lo tanto, al igual que ocurría con la HBB, sus medidas podrían verse alteradas por el protocolo de recogida, procesamiento y almacenamiento de las muestras, reduciendo su valor como marcador diagnóstico de la reacción.

A su vez, gran parte de los miARNs séricos circulantes se encuentran transportados por las VEs¹⁶¹. En consecuencia, se midieron los niveles del miR-21-3p, miR-487b-3p y miR-375-

3p dentro de estas partículas. Los resultados obtenidos demostraron un aumento del miR-21-3p y una reducción del miR-375-3p en las VEs purificadas a partir de la fase aguda respecto a las obtenidas de la basal, de acuerdo con sus análisis séricos. Sin embargo, no se determinaron cambios en los valores del miR-487b-3p (**Figura 61**).

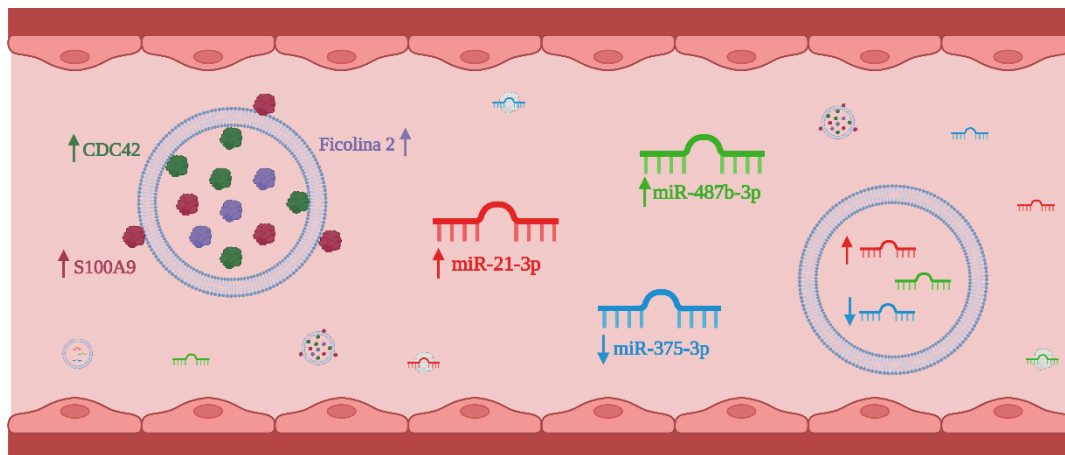


Figura 61. Representación gráfica de las proteínas de las VEs y de los miARNs validados en cohortes mayores de pacientes. Las flechas indican el aumento o descenso en la fase aguda respecto a la basal.

Por lo tanto, aun considerando que los hallazgos derivados de esta tesis son todavía de naturaleza exploratoria, estos resultados presentan un gran potencial clínico para el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas y proponen varios biomarcadores candidatos. Sin embargo, debido a la dificultad de obtener muestras de buena calidad, todavía son necesarios más estudios en un grupo más amplio de pacientes que permitan determinar la sensibilidad y especificidad de estas moléculas, así como confirmar su valor diagnóstico de manera individual o en combinación con la triptasa sérica.

6.2. Estudio de las bases moleculares de la anafilaxia

La anafilaxia es una reacción de hipersensibilidad sistémica grave en la que se encuentran implicados una gran variedad de microambientes celulares. Durante años, los estudios de la etiopatogenia de este evento patológico se han centrado en evaluar la participación del componente inmunológico¹⁵. No obstante, se ha demostrado la existencia de otros sistemas implicados en el desarrollo de la reacción⁹⁵. Sin embargo, la mayoría de estos datos se han obtenido en modelos de experimentación animal, por lo que los conocimientos relacionados con la anafilaxia en humanos siguen siendo escasos^{15,321}.

El proceso por el cual esta reacción inicialmente local termina convirtiéndose en sistémica se desconoce²⁹⁵. Precisamente, los distintos microambientes afectados durante este evento patológico no constituyen nichos aislados. Diferentes moléculas han sido descritas como mediadores de la interacción entre estos entornos³²². A su vez, las VEs y los miARNs se han postulado como actores clave en la comunicación celular en otras patologías^{124,162}. Además, se ha demostrado su implicación en el desarrollo de una gran variedad de enfermedades alérgicas^{126,168}. Sin embargo, nunca se había determinado su papel en la regulación de las bases moleculares subyacentes a la anafilaxia en humanos.

Por lo tanto, en esta tesis, se evaluó *in silico* la función coordinada de las diferentes proteínas caracterizadas en las VEs de plasma, así como de los miARNs identificados en suero. Este proceso se llevó a cabo mediante SBA, una técnica que permiten la integración de múltiples conjuntos de datos ómicos para descubrir los mecanismos alterados durante eventos

complejos, como la reacción anafiláctica³²³. Además, se estudió el impacto concreto de estas moléculas en el nicho endotelial mediante el uso de modelos celulares de anafilaxia *in vitro*.

6.2.1. Procesos biológicos relacionados con las proteínas de las vesículas extracelulares y asociados a la anafilaxia

El SBA del panel de 99 proteínas diferenciales entre las VEs de la fase aguda y la basal reveló diferentes procesos relacionados con la reacción anafiláctica, los cuales se discuten a continuación y se resumen en la **Figura 62**.

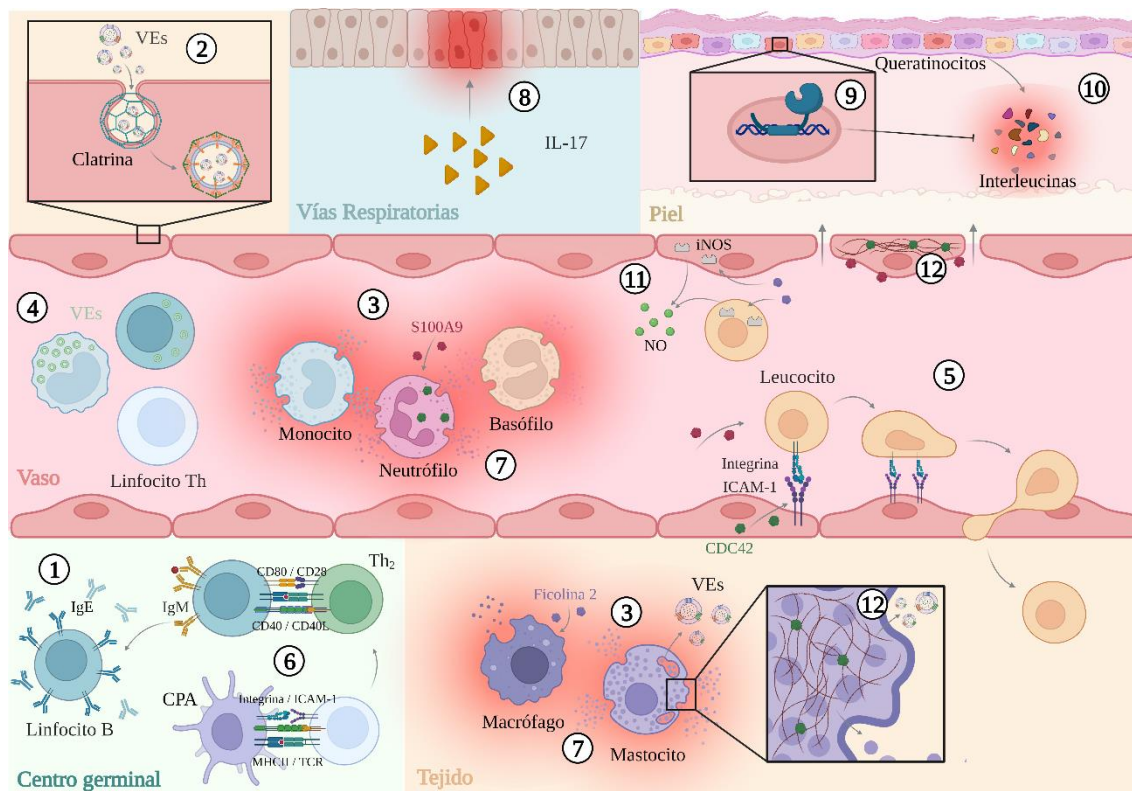


Figura 62. Resumen de las posibles funciones de las proteínas de las VEs en las bases moleculares subyacentes a la reacción. (1) Hipersensibilidad y alergia. (2) Endocitosis mediada por clatrina. (3) Degranulación de células, de fagocitos y de neutrófilos. (4) Captación de las VEs de los pacientes con anafilaxia por las PBMCs de donantes no atópicos. (5) Adhesión de células sanguíneas y extravasación a los tejidos. (6) Adhesión de células inmunes y formación de la sinapsis inmunológica. (7) Respuesta inflamatoria de fase aguda. (8) Efecto de la IL-17 en las vías respiratorias. (9) Señalización del receptor de glucocorticoides. (10) Queratinocitos y respuesta cutánea. (11) Señalización de la iNOS. (12) Organización del citoesqueleto de actina.

Los resultados obtenidos indicaron una participación de estas proteínas en la alergia y la hipersensibilidad, confirmando así la implicación de las VEs en las bases moleculares de la anafilaxia¹. Por otra parte, varias moléculas habían sido descritas previamente en procesos relativos a las vesículas. En concreto, se relacionaron con la endocitosis mediada por clatrina, un mecanismo crucial para la captación de las VEs por parte de las células diana^{324,325}.

A su vez, un 40% de las proteínas identificadas se asociaron con funciones inmunológicas. Entre los procesos encontrados destacan la degranulación de las células, de los neutrófilos y de los fagocitos. En concreto, en humanos, la anafilaxia se produce principalmente por la activación de los mastocitos y los basófilos, los cuales secretan varios mediadores inflamatorios que dan lugar a los signos y síntomas de la reacción¹⁵. Además, se ha visto que durante su degranulación también se produce una liberación de las VEs³²⁶. Sin embargo, cada vez hay más estudios que demuestran la participación de otras células inmunitarias en el desarrollo de este evento patológico, como los fagocitos y los neutrófilos⁹⁵. Precisamente,

los monocitos y los macrófagos se han descrito como agentes clave de las reacciones mediadas por IgG en modelos murinos de anafilaxia^{32,33}. A su vez, la incubación de las PBMCs con las VEs de los pacientes reveló que la población que captaba mayoritariamente dichas partículas eran los monocitos. Por otra parte, un estudio llevado a cabo recientemente en individuos con reacciones por medicamentos ha demostrado la implicación de los neutrófilos en la anafilaxia en humanos³⁷. Además, se ha observado que tanto la S100A9 como CDC42, dos de las proteínas validadas en una cohorte mayor de pacientes, inducen la liberación de mediadores por parte de estas células^{327,328}. No obstante, CDC42 también favorece la degranulación de los mastocitos³²⁹.

A su vez, otra de las funciones descritas en el SBA fue la adhesión de las células inmunológicas. Las moléculas implicadas en este proceso, como los receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas y las integrinas, desempeñan un papel vital en la regulación de todos los aspectos funcionales de las células inmunitarias, incluida la extravasación leucocitaria, la activación y proliferación de las células efectoras y la formación de la sinapsis inmunológica³³⁰. Precisamente, la migración de los leucocitos desde el torrente sanguíneo hasta los tejidos está orquestada por la acción conjunta de receptores de adhesión celular y factores quimiotácticos³³¹. Este proceso biológico se lleva a cabo principalmente en cuadros inflamatorios y ha sido descrito en anafilaxia^{332,333}. Además, se ha visto que la proteína S100A9 estimula la extravasación de leucocitos^{334,335}. Asimismo, se ha observado que CDC42 es necesaria para la expresión de ICAM-1, una molécula de la familia de las inmunoglobulinas inducible en las células inmunológicas y endoteliales en contextos de inflamación³³⁶. Esta proteína participa en la migración de los leucocitos hacia los tejidos y en la formación de la sinapsis entre las diferentes células inmunológicas³³⁷. La unión e interacción entre las CPA y los linfocitos T es crucial para la activación y el desarrollo de la respuesta alérgica³³⁸⁻³⁴⁰. A su vez, la colaboración entre los linfocitos T y B mediante diferentes moléculas de adhesión y estimuladoras es necesaria para que pueda llevarse a cabo el cambio de isotipo y la liberación de IgE³⁴¹⁻³⁴³.

En anafilaxia, la activación y degranulación de las células inmunológicas provoca la secreción de una gran variedad de mediadores que dan lugar a la inflamación subyacente a este evento patológico. Precisamente, entre las categorías derivadas del SBA destacan mecanismos relacionados con este proceso, como la respuesta de fase aguda. En este contexto, la Ficolina 2 participa en la liberación de varios agentes inflamatorios por parte de los macrófagos^{316,344}. A su vez, se observó una función de las proteínas de las VEs relativa a la señalización de la IL-17. Esta interleucina nunca se ha relacionado con la anafilaxia, aunque se ha asociado con el desarrollo de los casos más graves de asma, donde provoca inflamación de las vías respiratorias³⁴⁵.

Además, los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas revelaron un importante conjunto de queratinas diferenciales entre las VEs de la fase aguda y la basal. La naturaleza sistémica de la anafilaxia y, en particular, su relación con el daño epitelial y cutáneo apunta a un papel interesante de este grupo de proteínas, considerado durante mucho tiempo como contaminante en los análisis de proteómica. Las queratinas se liberan durante eventos patológicos en los que hay daño en la piel como resultado de la activación de los queratinocitos, unas células descritas en el campo de la alergia como una fuente sistémica de interleucinas^{346,347}. A su vez, el SBA asoció este conjunto de proteínas con la respuesta

mediada por los receptores de glucocorticoides, los cuales tienen un efecto antiinflamatorio en los queratinocitos y en las células del sistema inmunológico³⁴⁸⁻³⁵⁰. Precisamente, los glucocorticoides se utilizan como tratamiento de la anafilaxia para prevenir el desarrollo de reacciones bifásicas y reducir la inflamación³⁵¹.

Las proteínas de las VEs también se relacionaron con diferentes alteraciones del sistema cardiovascular subyacentes a este evento patológico. Por ejemplo, se asociaron con la señalización de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), una enzima que se ha visto aumentada en modelos murinos de anafilaxia y que produce el principal mediador vasodilatador de la reacción, el NO³⁵². A su vez, la Ficolina 2 también estimula la liberación de esta molécula³⁴⁴. Por otra parte, el panel de proteínas se relacionó con la organización del citoesqueleto de actina. En consecuencia, podrían desempeñar un papel fundamental en la regulación de la extravasación acontecida durante la anafilaxia³⁵³. Además, se ha descrito que la proteína S100A9 se une a las CEs e induce un aumento de la permeabilidad endotelial^{335,354}. En cambio, CDC42 es una de las principales proteínas estabilizadoras de la barrera endotelial³⁵⁵. Al mismo tiempo, la reorganización del citoesqueleto de actina es crucial para la degranulación de las células efectoras de la reacción³⁵⁶. En concreto, CDC42 regula este proceso, el cual se ha demostrado que es necesario para la liberación de los exosomas³⁵⁷.

Los cambios en la huella peptídica de las VEs podrían indicar las funciones que ejercen sobre sus células diana o los mecanismos moleculares alterados durante la reacción, ya que reflejan el estado de los tejidos que las secretan. Por lo tanto, caracterizar las diferentes subpoblaciones de VEs permitiría identificar los tipos celulares que las liberan. A su vez, evaluar la biodistribución de estas partículas determinaría cuáles son sus órganos diana y si su captación varía entre los diferentes microambientes anafilácticos.

6.2.2. Procesos biológicos asociados al miR-21-3p, miR-487b-3p y miR-375-3p en anafilaxia

Cada miARN puede reconocer múltiples ARNm diana, por lo que estas moléculas participan en la regulación de una gran variedad de procesos biológicos de manera simultánea¹⁵⁶. Además, tanto un aumento como un descenso de sus niveles se han relacionado con el desarrollo de enfermedades¹⁶². Por lo tanto, para evaluar las posibles consecuencias de los cambios del miR-21-3p, miR-487b-3p y miR-375-3p en las bases moleculares de la reacción, se realizó un SBA con sus genes diana.

En conjunto, los resultados obtenidos revelaron dos procesos clave en la anafilaxia: la inflamación y las anomalías de los órganos. Por lo tanto, confirmaron la implicación de dichos miARNs en los mecanismos moleculares de este evento patológico, ya que la anafilaxia consiste en una reacción inflamatoria sistémica en la que se producen alteraciones en distintos órganos y/o sistemas¹⁵. A su vez, los SBA destacaron distintas vías de señalización canónicas, como la respuesta de fase aguda, reguladas por sus genes dianas y asociadas a dichos procesos, las cuales se resumen en la **Figura 63**.

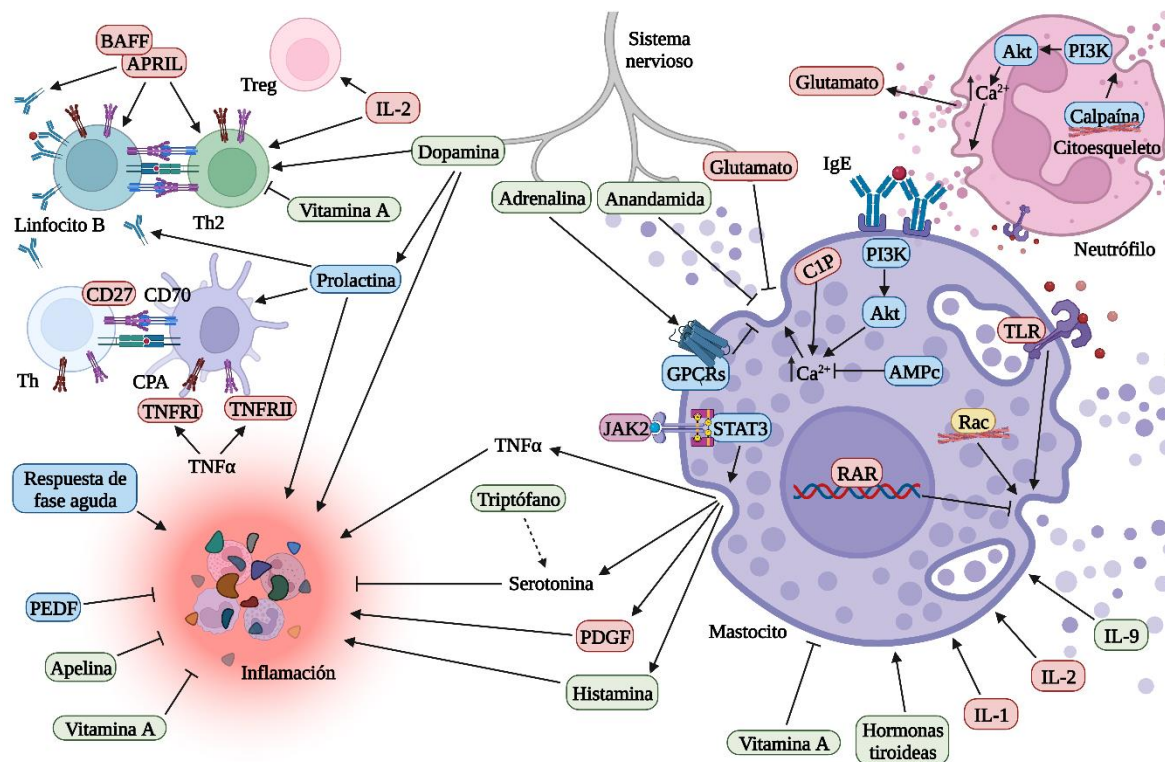


Figura 63. Resumen de las vías de señalización relacionadas con los procesos inflamatorios derivados de los SBA de los miARNs estudiados. En rojo se indican las rutas moleculares descritas en el miR-21-3p, en verde las del miR-487b-3p y en azul las del miR-375-3p. Además, en amarillo se señala la vía modulada por el miR-21-3p y el miR-375-3p, mientras que en morado se distingue la regulada por el miR-487b-3p y el miR-375-3p.

En humanos, la inflamación subyacente a anafilaxia se atribuye a la liberación de mediadores por parte de los mastocitos y basófilos²⁵. Precisamente, entre las vías de señalización molecular identificadas en el SBA se describieron varios mecanismos relacionados con la degranulación de estas células, de manera semejante a lo observado en el estudio de las proteínas de las VEs. En concreto se vio que estos miARNs regulaban la señalización de la PI3K/Akt, las ceramidas, el AMPc, Rac, la calpaína, los *Toll-like receptor* (TLR) y los receptores del ácido retinoico (RAR). En primer lugar, la vía de la PI3K/Akt se activa de manera dependiente de IgE y aumenta los niveles intracelulares de calcio, induciendo la liberación de mediadores por parte de los mastocitos y los basófilos³⁵⁸⁻³⁶⁰. En relación, un estudio llevado a cabo en un modelo murino de anafilaxia ha demostrado que el miR-155 regula esta ruta controlando la degranulación de los mastocitos¹⁷⁰. No obstante, la PI3K/Akt también interviene en la liberación de mediadores por parte de los neutrófilos, cuya participación en las reacciones anafilácticas humanas ha sido demostrada recientemente^{37,361,362}. Asimismo, la ceramida 1-fosfato (C1P) puede inducir la degranulación de los mastocitos en un proceso mediado por los niveles de calcio^{363,364}. En cambio, la señalización por AMPc reduce los niveles intracelulares de calcio e inhibe la liberación de mediadores por parte de los mastocitos y los basófilos³⁶⁵⁻³⁶⁷. Por otra parte, Rac es una Ras GTPasa que regula el citoesqueleto de actina modulando la degranulación de los mastocitos^{329,368}. De igual manera, la calpaína es una proteasa que interviene en el reordenamiento del citoesqueleto de los neutrófilos causando la liberación de mediadores³⁶⁹. A su vez, la activación de los TLR puede inducir la degranulación directa de los mastocitos y los neutrófilos^{362,370,371}. En cambio, los RAR tienen un efecto antiinflamatorio, ya que inhiben la liberación de mediadores por parte de los mastocitos³⁷².

Además, el análisis de las dianas del miR-21-3p, miR-487b-3p y miR-375-3p reveló que estas moléculas participaban en la aparición de los signos y síntomas propios de la anafilaxia. Entre ellos, las manifestaciones cutáneas son las más comunes en los pacientes (80-90%) mientras que las alteraciones digestivas se detectan en un 45% de los casos⁵. En consonancia con estos datos, el SBA destacó las enfermedades dermatológicas y gastrointestinales entre los principales trastornos relacionados con los miARNs estudiados, reforzando su implicación en la anafilaxia. Además, se identificaron diferentes vías moleculares asociadas con este evento patológico. En primer lugar, se observó que regulaban la señalización de los GPCRs, los principales receptores de los mediadores anafilácticos⁶⁴. Además, modulaban la señalización del PDGF, una molécula liberada por los mastocitos que ha sido descrita como un agente inflamatorio en asma³⁷³. Por otra parte, controlaban la degradación de la histamina, uno de los mediadores cruciales para el desarrollo de la reacción anafiláctica y el principal causante de la gran mayoría de los síntomas de este evento patológico¹⁵.

Por otra parte, el SBA indicó la participación del miR-21-3p, miR-487b-3p y miR-375-3p en las funciones del sistema nervioso, el cual se encuentra alterado en un 15% de los pacientes con anafilaxia⁵. Actualmente, diferentes estudios han relacionado este sistema con la alergia. En concreto, se ha demostrado su participación en la presentación antigénica, en la producción de IgE y en la degranulación de los mastocitos, entre otros³⁷⁴. A su vez, la activación de los mastocitos mediada por IgE induce la liberación de serotonina, un neurotransmisor que ejerce un efecto antiinflamatorio³². En relación, el triptófano es el aminoácido precursor de esta molécula y su degradación estaba modulada por estos miARNs³⁷⁵. Precisamente, se han descrito alteraciones en el metabolismo del triptófano en pacientes alérgicos³⁷⁶. Por otra parte, los SBA revelaron que estos miARNs participaban en la degradación de la anandamida, la adrenalina, el glutamato y la dopamina. La anandamida es una molécula del sistema endocannabinoide que puede inhibir la degranulación dependiente de IgE y la síntesis de citocinas de los mastocitos^{377,378}. A su vez, la adrenalina es el tratamiento de primera línea de la anafilaxia, aunque también puede secretarse de forma endógena ayudando a paliar los síntomas de este evento patológico³⁷⁹. Esta molécula, a través de sus receptores β_2 , inhibe la degranulación de las células efectoras de la reacción⁶⁴. Asimismo, el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso y puede liberarse por los nervios presentes en la piel bloqueando la degranulación de los mastocitos y reduciendo la inflamación cutánea^{380,381}. No obstante, también puede secretarse desde otras células, como los neutrófilos³⁸². Por otra parte, la dopamina es un neurotransmisor generado principalmente en la sustancia negra del cerebro. Esta molécula se ha relacionado con un aumento de la inflamación alérgica y con la polarización de la respuesta hacia un fenotipo Th2³⁸³. Además, actúa como una neurohormona induciendo la liberación de prolactina en la hipófisis, cuya señalización también estaba regulada por estos miARNs. A su vez, la prolactina aumenta la producción de inmunoglobulinas, estimula la presentación antigénica e induce un estado inflamatorio^{384,385}. Por último, se identificó un papel de los miARNs en el metabolismo de las hormonas tiroideas, las cuales pueden inducir la activación de los mastocitos^{386,387}.

Los SBA también identificaron procesos relacionados con el factor de necrosis tumoral- α (TNF α) a través de la señalización de la superfamilia de receptores de TNF (TNFR) y de sus ligandos. El TNF α se libera durante la reacción anafiláctica principalmente por la activación y degranulación de los mastocitos³⁸⁸. En concreto, se han descrito niveles elevados de esta

molécula tanto en modelos experimentales como en muestras séricas de pacientes con anafilaxia^{307,389,390}. Este mediador induce varios mecanismos moleculares, como la respuesta adaptativa y la inflamación, a través de su unión a los TNFRI y TNFRII, cuya señalización estaba regulada por dichos miARNs³⁹¹⁻³⁹³. Precisamente, se ha observado un aumento de los valores del TNFRI en los pacientes con anafilaxia grave^{389,394}. Sin embargo, dentro de la superfamilia existen otras moléculas como RANK y CD27, las cuales también se modulaban por estos miARNs³⁹¹. La unión de CD27 con su ligando CD70 es necesaria para la expansión clonal de los linfocitos T, para la presentación antigénica de las CPA y para inducir la síntesis de inmunoglobulinas y citocinas por los linfocitos B³⁹⁵. Además, es fundamental para la respuesta humoral y el mantenimiento de la memoria inmunológica³⁹⁶. Por otra parte, los genes diana de los miARNs regulaban la señalización de dos ligandos de los TNFR, el factor activador de linfocitos B (BAFF) y el ligando inductor de la proliferación (APRIL). Ambos mediadores son necesarios para la maduración, supervivencia y síntesis de anticuerpos de los linfocitos B, así como para la activación y diferenciación de los linfocitos Th³⁹⁷.

En cambio, los SBA también revelaron la implicación de los miARNs en la señalización de diferentes mediadores antiinflamatorios. En concreto, se describió que participaban en la biosíntesis de retinoides, los cuales son los precursores de la vitamina A, una molécula antiinflamatoria^{398,399}. En alergia, la ausencia de esta vitamina aumenta la respuesta de tipo Th2, la activación de los mastocitos y el estado inflamatorio⁴⁰⁰. A su vez, los miARNs regulaban la señalización de apelina, una molécula que bloquea la liberación de citocinas por parte de los macrófagos y reduce el cuadro inflamatorio agudo de varias enfermedades⁴⁰¹. Asimismo, modulaban la respuesta del PEDF, un mediador que inhibe la inflamación de las vías respiratorias en asma⁴⁰².

Por otra parte, el SBA identificó la participación de los miARNs en la señalización de tres interleucinas: IL-1, IL-2 e IL-9. Esta familia de citocinas ya había sido descrita previamente en anafilaxia. En concreto, se ha demostrado que los niveles séricos de IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 aumentan en los pacientes con reacciones graves³⁸⁹. La familia de IL-1 está formada por varios agentes inflamatorios y antiinflamatorios, siendo la IL-1 β su miembro más estudiado. La producción de esta molécula se induce por el TNF α y consiste en uno de los mediadores fundamentales en la inflamación⁴⁰³. Precisamente, la IL-1 estimula la producción de IL-3, IL-5, IL-6, IL-9 y TNF α en los mastocitos⁴⁰⁴. Por otra parte, la IL-2 es un factor de crecimiento esencial para la proliferación de las células T, para la respuesta efectora y para el mantenimiento de los linfocitos T reguladores (Treg)⁴⁰⁵. Sin embargo, su función en anafilaxia es ambigua. El tratamiento con IL-2 previo a la sensibilización presenta un efecto protector, ya que aumenta las poblaciones de Treg e inhibe la sensibilización específica al alérgeno. No obstante, su administración a los ratones ya sensibilizados incrementa la respuesta de los Th y de los mastocitos provocando una mayor gravedad de la reacción⁴⁰⁶. A su vez, la IL-9 puede liberarse por los mastocitos y tiene un efecto pleiotrópico, ya que modula una gran variedad de funciones, como la respuesta inflamatoria^{404,407}. Además, se ha descrito que esta interleucina promueve el desarrollo de la anafilaxia sistémica, actuando tanto en la etapa de sensibilización como en la efectora⁴⁰⁸. En consecuencia, se ha postulado como uno de los mediadores que podrían amplificar la respuesta para que este evento patológico pase de local a sistémico⁴⁰⁹.

Por último, durante todos estos procesos se produce la liberación de varias citocinas y quimiocinas que se unen a sus receptores para ejercer su acción en las células diana²⁹⁵. Entre ellos, los miARNs modulaban la señalización de JAK2, la cual ha sido relacionada con la dermatitis atópica⁴¹⁰. Estos receptores se encuentran asociados a quinasas que activan diferentes factores de transcripción STAT y participan tanto en la inflamación alérgica como en la respuesta Th2⁴¹¹⁻⁴¹⁴. En concreto, el bloqueo de JAK en los mastocitos previene las reacciones de hipersensibilidad inmediata y anafilácticas⁴¹⁵. Por otra parte, el SBA indicó que los miARNs regulaban la señalización de STAT3. Esta molécula se ha asociado con diferentes patologías y se ha descrito como un factor de transcripción necesario para la degranulación de los mastocitos^{416,417}. Precisamente, la inhibición de STAT3 reduce el proceso inflamatorio, por lo que se postula como una diana terapéutica prometedora⁴¹⁸.

6.2.3. Efecto del miR-21-3p, miR-487b-3p y miR-375-3p en la fisiopatología cardiovascular de la anafilaxia

Entre las vías de señalización molecular destacadas por los SBA también se identificaron varias relacionadas la fisiopatología cardiovascular de la anafilaxia (**Figura 64**). Precisamente, los mediadores liberados durante la reacción ejercen su acción sobre las células de este sistema a través de los GPCRs y causan las alteraciones subyacente a este evento patológico, las cuales determinan el desarrollo de los casos más graves⁶⁴. Por ejemplo, la histamina provoca un aumento de la vasodilatación periférica, de la permeabilidad endotelial y de la vasoconstricción torácica^{96,419-421}. En cambio, la adrenalina actúa sobre sus receptores adrenérgicos corrigiendo todos estos procesos⁶⁴.

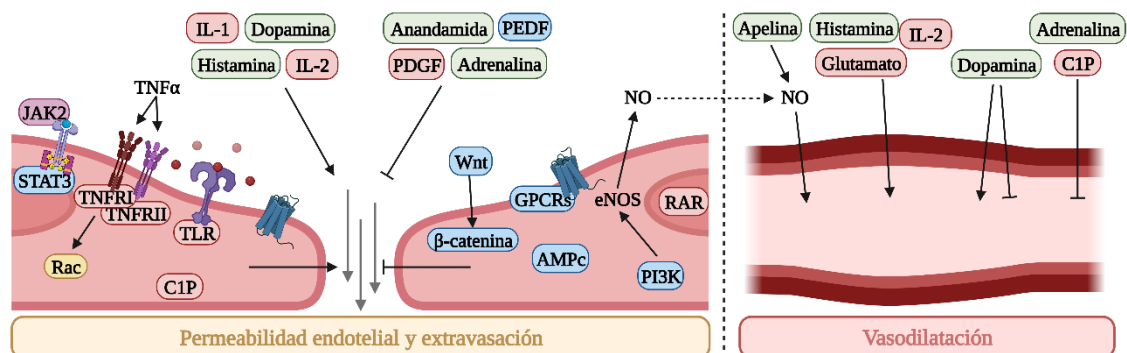


Figura 64. Representación gráfica de las vías de señalización asociadas con la fisiopatología vascular de la anafilaxia acorde a los SBA de los miARNs. En rojo se indican las rutas moleculares descritas en el miR-21-3p, en verde las del miR-487b-3p y en azul las del miR-375-3p. Además, en amarillo se señalan la vía modulada por el miR-21-3p y el miR-375-3p, mientras que en morado se distingue la regulada por el miR-487b-3p y el miR-375-3p.

En concreto, algunos de los mecanismos moleculares regulados por los miARNs se asocian con la permeabilidad endotelial. Entre ellos destaca la señalización de Rac, una ruta imprescindible para mantener la integridad del endotelio y que modula los cambios causados por los diferentes mediadores anafilácticos^{422,423}. Precisamente, la rotura de la barrera endotelial derivada de la activación de los TNFR1 y II ocurre en un proceso mediado por esta proteína⁴²⁴. A su vez, la señalización de los TLR, de JAK2 y STAT3 induce un aumento de la permeabilidad endotelial^{425,426}. Además, varias de las moléculas detalladas previamente, como la dopamina, la IL-1, la IL-2 y la C1P, provocan una rotura de la barrera endotelial⁴²⁷⁻⁴³⁰. Por el contrario, las vías de la PI3K, el AMPc y Wnt/ β -catenina son estabilizadoras de dicho proceso^{431,432}. Del mismo modo, el PEDF y la isoforma B del PDGF están implicadas en la integridad del endotelio⁴³³⁻⁴³⁶. Asimismo, la anandamida y la activación de los RAR reducen la permeabilidad en la barrera hematoencefálica^{437,438}.

Por otra parte, algunas de las vías de señalización molecular detalladas anteriormente también modulan la vasodilatación. En concreto, la PI3K es crucial para el desarrollo del choque anafiláctico, ya que activa la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) induciendo la producción de NO, el principal mediador vasodilatador de este evento patológico. Por lo tanto, esta proteína se postula como una diana terapéutica prometedora en anafilaxia³¹⁰. Asimismo, la apelina también favorece la liberación de NO⁴⁰¹. Además, se ha descrito un efecto vasodilatador del glutamato y de la IL-2^{439,440}. En cambio, la C1P produce vasoconstricción en las arterias cerebrales⁴³⁰. No obstante, la dopamina presenta un efecto dual ya que puede ejercer vasodilatación o vasoconstricción en función del receptor sobre el que actúe^{441,442}.

6.2.4. Función de las vesículas extracelulares y los microARNs en las células endoteliales de la microvasculatura

Los SBA realizados con el panel de las 99 proteínas de las VEs y con los genes diana del miR-21-3p, miR-487b-3p y miR-375-3p aportan una visión general de las posibles funciones en las que están implicadas estas moléculas durante la anafilaxia. No obstante, estos procesos pueden no verse reflejados en los diferentes microambientes celulares, por lo que es necesario evaluarlos detalladamente. En consecuencia, gran parte de las investigaciones realizadas en esta tesis se han focalizado en el estudio del endotelio (**Figura 65**), uno de los principales órganos afectados durante este evento patológico⁶⁴. La heterogeneidad de las CEs que componen los vasos propicia diferentes efectos de los mediadores anafilácticos entre las distintas secciones del árbol vascular, siendo la microvasculatura aquella donde se produce mayoritariamente la disrupción de la barrera endotelial⁸⁷⁻⁸⁹. Por lo tanto, todos los ensayos funcionales realizados en esta tesis se llevaron a cabo en modelos *in vitro* de HMVEC.

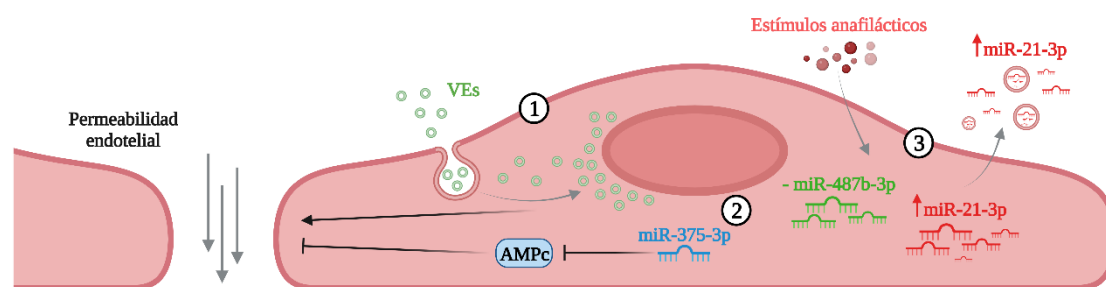


Figura 65. Representación gráfica de los ensayos funcionales en HMVEC. (1) Las VEs de los pacientes con anafilaxia inducen un aumento de la permeabilidad endotelial. (2) El miR-375-3p bloquea parcialmente la respuesta a AMPc. (3) La incubación de las CEs en condiciones anafilácticas provoca un aumento de los niveles intracelulares del miR-21-3p e induce su liberación al suero de la fase aguda usado como estímulo.

Actualmente, se ha demostrado la implicación de una gran variedad de mediadores en el aumento de la permeabilidad endotelial durante la anafilaxia, un trastorno que ocurre principalmente en los casos más graves^{64,443}. Sin embargo, se han descrito otras moléculas que también podrían intervenir en este proceso. Por ejemplo, las VEs participan en la desestabilización de la barrera endotelial en enfermedades inflamatorias como la sepsis o el cáncer^{312,444}. No obstante, hasta ahora, nunca habían sido estudiadas en anafilaxia. Los resultados derivados de esta tesis revelaron que las VEs purificadas a partir de la fase aguda inducían un aumento de la permeabilidad endotelial respecto aquellas obtenidas de la basal, por lo que podrían estar implicadas en la rotura de la barrera endotelial subyacente a este evento patológico. Además, las vesículas captadas por las CEs se localizaban

preferentemente en la zona perinuclear, pudiendo participar en la regulación del tráfico intracelular y de la expresión génica en estas células⁴⁴⁵.

A su vez, un estudio llevado a cabo en cáncer de pulmón demostró que las VEs liberadas por las células tumorales estaban cargadas con el miR-375-3p y podían ser internalizadas por las CEs, causando un aumento de la permeabilidad endotelial⁴⁴⁶. En relación, el SBA de los genes diana de este miARN reveló varios procesos asociados con la integridad del endotelio. Entre ellos, destaca la señalización del AMPc, una molécula esencial para la estabilización de la barrera endotelial⁴⁴³. Durante años, se ha considerado el AMPc como un segundo mensajero. Sin embargo, se ha demostrado que esta molécula también se puede secretar por las células y actuar como mediador a través de la unión a sus receptores, los cuales forman parte de la familia de los GPCRs⁴⁴⁷⁻⁴⁴⁹. Asimismo, se ha visto que las VEs liberadas por las CEs están enriquecidas en AMPc⁴⁵⁰. En consecuencia, para determinar el efecto del miR-375-3p en la respuesta a este mediador, se llevaron a cabo ensayos de permeabilidad *in vitro* en HMVEC transfectadas con este miARNs. Los resultados obtenidos demostraron que el aumento del miR-375-3p bloqueaba parcialmente la estabilización de la barrera endotelial mediada por el AMPc. Por lo tanto, los cambios en los niveles de este miARN podrían estar implicados en los mecanismos moleculares asociados a la fisiopatología vascular de la anafilaxia.

Asimismo, los SBA del miR-21-3p y del miR-487b-3p identificaron varias vías de señalización molecular descritas en las CEs y asociadas con la permeabilidad endotelial. Por lo tanto, se evaluó si los niveles intracelulares de estos miARNs se modificaban tras la incubación de las HMVEC en condiciones anafilácticas. Precisamente, los valores del miR-21-3p aumentaron tras el estímulo de las células con el cóctel de mediadores y con el suero de la fase aguda de los pacientes con anafilaxia. Estos datos se asemejan con lo observado en otros estudios donde los niveles de este miARN se elevan en las CEs en respuesta a moléculas inflamatorias, como el TNF α o la IL-1 β ⁴⁵¹. Sin embargo, no se observaron cambios en el miR-487b-3p.

Por otra parte, se ha demostrado que el endotelio desempeña una función efectora durante la reacción anafiláctica, ya que puede producir mediadores inflamatorios y vasoactivos, así como estimular la activación de las vías de la coagulación, el contacto y el complemento⁶⁴. En consecuencia, se evaluó la contribución de las CEs a los niveles circulantes del miR-21-3p y del miR-487b-3p. Para ello, se midieron los valores de ambos miARNs en el suero de los pacientes antes y después de la incubación con las HMVEC. El análisis demostró un aumento del miR-21-3p, pero no de miR-487b-3p, en las muestras de la fase aguda tras el contacto con las CEs. Este incremento podría deberse a la liberación de VEs enriquecidas en miR-21-3p en respuesta a varios de los mediadores implicados en la anafilaxia, un proceso descrito en otros estudios²⁵³.

7. LIMITACIONES

LIMITACIONES

Los resultados derivados de esta tesis suponen un avance en el campo de la investigación en alergología e identifican varios mediadores que no habían sido descritos en anafilaxia hasta la fecha. Sin embargo, los datos obtenidos son en su gran mayoría de naturaleza exploratoria. Por lo tanto, es necesario validar las diferentes moléculas caracterizadas en cohortes con un mayor número de muestras para poder determinar su uso como biomarcadores y establecer su sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de este evento patológico. No obstante, el reclutamiento de los pacientes con anafilaxia es una tarea ardua y complicada. A su vez, es preciso dilucidar los mecanismos moleculares relacionados con estos mediadores, ya que esto permitiría identificar dianas terapéuticas prometedoras.

7.1. Heterogeneidad de los pacientes y las reacciones

Todos los estudios se han desarrollado a partir de las muestras de pacientes con anafilaxia. En consecuencia, una de las limitaciones principales de esta tesis fue la heterogeneidad de los diferentes individuos incluidos en los análisis. No obstante, se intentó minimizar este problema realizando todas las aproximaciones de manera pareada entre la fase aguda y la basal de cada paciente.

A su vez, las reacciones anafilácticas son muy diversas, por lo que presentan varios aspectos que pueden influir en su desarrollo. Sin embargo, resulta muy complicado estratificar entre las diferentes variables, ya que se perdería potencia estadística y no disponemos de un grupo de pacientes lo suficientemente grande. Además, al reducir la muestra aumentarían las interferencias causadas por la variabilidad de los individuos.

Una de las limitaciones en los estudios de anafilaxia son las diferencias entre los distintos desencadenantes, ya que no todos los alérgenos activan los mismos mecanismos moleculares. Por ejemplo, en el caso de las reacciones por medicamentos, se han descrito fármacos que pueden inducir vías dependientes de IgE, mientras que otros activan rutas independientes de IgE^{24,452}. Además, durante esta tesis, prácticamente no se analizaron pacientes con anafilaxia por veneno de himenópteros, uno de los alérgenos más estudiado en este evento patológico^{453,454}. Esto se debió a la escasa disponibilidad de muestras de sujetos con reacciones causadas por este desencadenante.

Asimismo, otro de los problemas fueron las diferencias derivadas del lugar de obtención de las muestras, ya que unas se recogieron en las unidades de alergología y otras en los servicios de urgencias. Esto provoca que existan cambios en el tiempo que transcurre desde que se desarrolla la anafilaxia hasta que se recoge la fase aguda y, por consiguiente, en la gravedad de la reacción. Precisamente, todas las muestras de niños se recogieron como resultado de pruebas de provocación y la gravedad en estos casos es menor. Además, otro inconveniente relacionado con este grupo fue la ausencia de reacciones mediadas por medicamentos. Sin embargo, la población pediátrica es la cohorte más homogénea, dado que todas las muestras se obtuvieron de un único hospital, evitando así otra de las limitaciones de esta tesis, que son las pequeñas diferencias en los procesos de recogida entre los distintos centros, aun atendiendo a un protocolo común.

A su vez, otro factor que podría alterar las medidas de las moléculas estudiadas fue el tratamiento de los pacientes. En todos los casos se priorizó la salud de los individuos, por lo que algunas muestras agudas se recogieron después de administrar la medicación. Además,

no siempre se aplicaron los mismos fármacos, por lo que también podría haber variaciones derivadas de estos cambios.

La ausencia de una definición clara de la anafilaxia es una de las principales limitaciones en el estudio de este evento patológico. Esto provoca que la clasificación de la gravedad de las reacciones sea compleja y no esté clara. Concretamente, en esta tesis se siguieron los criterios establecidos por Brown, aunque estas directrices no diferencian bien los niveles de gravedad leves y moderados¹⁸³. Recientemente se han propuesto nuevas clasificaciones que permiten estratificar mejor a los pacientes^{1,97}. No obstante, no se pudieron aplicar a los análisis incluidos en esta tesis debido a que, en la mayoría de los casos, los datos clínicos recogidos no contenían toda la información necesaria.

A su vez, otro problema es la ausencia de controles sanos en los estudios. No obstante, consideramos que es muy complicado definir dicha población. El único grupo utilizado como control fueron los pacientes de Grado 1, ya que no desarrollan anafilaxia. Sin embargo, estos presentan varios inconvenientes como que solo se tienen muestras de individuos adultos y que todos los casos fueron causados por medicamentos. Por lo tanto, no son representativos de la población con anafilaxia, dado que no hay niños ni adultos con reacciones por alimentos.

7.2. Calidad y cantidad de las muestras de sangre periférica

Las muestras de sangre periférica de los pacientes con anafilaxia también presentaron varias limitaciones. En primer lugar, cabe destacar que la cantidad de suero y/o plasma disponible es finita. Por lo tanto, varios individuos no se pudieron analizar en todas las aproximaciones abordadas en esta tesis. Además, en la población pediátrica solo se recogieron muestras séricas para evitar sacar tanta sangre a los niños.

De cada paciente se obtuvieron dos tubos de suero y plasma de cada fase. No obstante, en ocasiones uno de ellos estaba más hemolizado que el otro, pudiendo causar variaciones. En consecuencia, se intentó usar siempre la misma alícuota para todos los análisis incluidos en esta tesis. Sin embargo, no siempre fue posible, dado que algunos experimentos requerían un mayor volumen de muestra.

A su vez, otra de las limitaciones fueron las interferencias causadas por la hemólisis. Esto es algo esperable en los estudios de anafilaxia, ya que durante la reacción se activan varios procesos que pueden provocar una ruptura de los glóbulos rojos^{83,295}. Sin embargo, esto también puede ocurrir a causa del protocolo de recogida, procesamiento y almacenamiento de las muestras. Precisamente, las diferencias encontradas en la HBB podrían deberse a la hemólisis. A su vez, la hemoglobina tiñe de rojo las muestras, interfiriendo con las medidas de la concentración de proteínas séricas, ya que esta se determinó mediante un método colorimétrico. Además, este factor obligó a descartar un gran número de muestras de los análisis de los miARNs, dado que la lisis de los glóbulos rojos provoca la salida de varias de estas moléculas alterando sus medidas³²⁰.

7.3. Problemas asociados a las determinaciones de proteínas séricas

En el caso de los análisis de la triptasa sérica una de las limitaciones fue el tiempo de recogida de las muestras, ya que este proceso se intentó hacer siempre lo más rápido posible. No obstante, el pico de esta proteína se alcanza a las 2 horas de la reacción⁴⁴. Además, puede haber diferencias en las medidas de triptasa en función del desencadenante de la anafilaxia.

LIMITACIONES

En concreto, se ha descrito que los alimentos causan elevaciones menores de este marcador que los medicamentos⁴³.

A su vez, el estudio de la ASH y de la HBB se realizó mediante métodos semicuantitativos, los cuales son menos precisos y dificultan establecer umbrales de referencia para el uso de estas proteínas como biomarcadores diagnósticos de anafilaxia. Además, los análisis se llevaron a cabo con programas de procesamiento de imágenes, unas aproximaciones más complicadas de estandarizar y donde el ruido de fondo es difícil de eliminar.

7.4. Limitaciones de los estudios ómicos

Una de las limitaciones de las técnicas ómicas es el escaso número de muestras que se utilizan para estos análisis. El hecho de usar un grupo pequeño de pacientes para el estudio de una reacción tan heterogénea como es la anafilaxia dificulta la selección de un conjunto representativo de la población. En consecuencia, para el análisis de las proteínas de las VEs, se intentó plasmar la diversidad de la reacción eligiendo casos variados. Sin embargo, para el desarrollo del NGS se escogieron individuos con una franja de edad y desencadenante concretos. A su vez, en la población pediátrica se seleccionaron aquellos con mayor gravedad, mientras que en los adultos se buscó representar la heterogeneidad de la reacción incluyendo casos moderados y graves. En consecuencia, el número de miARNs identificados significativamente fue mayor en los niños que en los adultos, ya que era una población más homogénea.

A su vez, se identificaron pocos miARNs con FDR debido a la heterogeneidad de los pacientes, por lo que este criterio no se tuvo en cuenta a la hora de elegir las dianas de validación. Además, algunas de las moléculas significativas no se detectaron en todas las muestras analizadas por NGS. Ambos problemas se reflejaron en los análisis mediante qPCR, donde no se observaron cambios en muchos de los miARNs diana seleccionados y algunos de ellos no se identificaron en las muestras.

7.5. Variaciones metodológicas de los estudios de las vesículas extracelulares

El análisis de las proteínas de las VEs se llevó a cabo a partir de plasma debido a que se obtenía un mayor rendimiento. Sin embargo, el uso de estas muestras dificulta su comparación con el resto de los estudios incluidos en esta tesis, los cuales se realizaron en suero.

Las VEs purificadas para el estudio de los miARNs se aislaron desde suero con un kit comercial porque era necesario menos volumen de muestra. Sin embargo, este kit está enfocado a la obtención de exosomas, por lo que podría haber variaciones en las poblaciones de vesículas en comparación con las aisladas por ultracentrifuga.

Asimismo, otro de los problemas es que no existe ningún control endógeno fidedigno para los análisis de las VEs. Por lo tanto, los datos de validación obtenidos mediante Western blot se normalizaron respecto a la concentración de proteínas total de la muestra. No obstante, esta no tiene en cuenta las posibles interferencias acontecidas durante el desarrollo de la técnica.

Los estudios de captación de las VEs se llevaron a cabo en tres poblaciones de PBMCs: los monocitos, los linfocitos B y los linfocitos Th. Sin embargo, no se evaluaron los linfocitos

LIMITACIONES

T citotóxicos (Tc) y las células asesinas naturales (NK). Estas células también forman parte de las PBMcs, pero no se valoraron debido a que los citómetros no permitían analizar más poblaciones de manera simultánea.

A su vez, las muestras utilizadas para caracterizar las VEs por NTA se congelaron previamente, dado que era necesario transportarlas. No obstante, este proceso puede provocar su agregación y alteraciones en las medidas. Además, la sensibilidad del NTA en las VEs menores de 100 nm es baja.

7.6. Problemas de los análisis de microARNs

De manera semejante a las VEs, uno de los problemas en el estudio de los miARNs es la ausencia de un control endógeno fidedigno para la normalización de los datos. Por lo tanto, para los estudios incluidos en esta tesis se utilizó el miR-30e-3p, de acuerdo con lo sugerido por el NGS. Sin embargo, este miARN también se ha descrito como diana en otras patologías⁴⁵⁵.

A su vez, el análisis del miR-21-3p y del miR-487b-3p no se realizó en una cohorte independiente de pacientes pediátricos debido a la baja disponibilidad de muestras. Además, sus valores no mostraron diferencias significativas en la población adulta, aunque estos resultados también podrían indicar un endotipo concreto de la reacción.

Asimismo, los ensayos funcionales de los miARNs no se realizaron en cada caso con las tres moléculas validadas. Por lo tanto, habría que determinar los niveles intracelulares del miR-375-3p y tras el contacto con las CEs, así como evaluar los cambios en la permeabilidad endotelial tras la transfección con el miR-21-3p y el miR-487b-3p.

7.7. Limitaciones de los análisis de biología de sistemas

Los SBA aportan una visión general de los procesos implicados en la reacción e identifican una gran variedad de categorías funcionales asociadas con la lista de genes estudiados. Sin embargo, en muchos casos las moléculas descritas en una vía pueden ser antagónicas entre sí. Por lo tanto, una función sugerida por el SBA podría no ocurrir en cada uno de los microambientes afectados. Además, los cambios observados en suero podrían no verse reflejados a nivel celular. En consecuencia, es necesario confirmar específicamente cada una de ellas en los nichos celulares y tejidos de interés.

7.8. Problemas de los ensayos *in vitro* de células endoteliales

Por último, las limitaciones en los ensayos funcionales se deben principalmente al tipo celular utilizado. El endotelio de los vasos es muy heterogéneo y varía entre las diferentes secciones de la vasculatura⁶⁴. Los estudios realizados en esta tesis se llevaron a cabo en modelos *in vitro* de microvasculatura. Sin embargo, los datos obtenidos podrían no extrapolarse a otros tipos celulares como la barrera hematoencefálica o la macrovasculatura, ya que presentan una estructura, función y composición distinta.

Asimismo, el ensayo funcional de las VEs se desarrolló en HMVEC-L, mientras que los análisis de los miARNs se hicieron en HMVEC-D. Ambos cultivos celulares primarios derivan de microvasculatura por lo que no esperamos que hubiera diferencias entre ellos. Sin embargo, sería necesario realizar estudios en paralelo con ambos tipos celulares para confirmarlo.

LIMITACIONES

A su vez, cabe destacar que otra de las limitaciones de los estudios *in vitro* son los tiempos de incubación. La anafilaxia consiste en una reacción rápida, pero algunas determinaciones se realizaron transcurridas horas desde la estimulación de las células. No obstante, estos ensayos no consideran todos los factores implicados en dichos procesos, por lo que se asumen diferencias y variaciones en el tiempo de respuesta en comparación con las condiciones fisiológicas.



8. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La consideración de las medidas basales de triptasa sérica en los pacientes con anafilaxia mejora su sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la reacción.
2. La concentración de proteínas séricas y los niveles de ASH disminuyen en los pacientes con anafilaxia acorde a la gravedad de la reacción, permitiendo cuantificar indirectamente la extravasación vascular subyacente a este evento patológico y proponiéndose como posibles biomarcadores. Además, el suplemento de ASH se postula como una nueva estrategia terapéutica.
3. La HBB aumenta en el suero de los pacientes con hipersensibilidad independientemente de la gravedad de la reacción.
4. Las VEs de los pacientes con anafilaxia presentan un perfil de 99 proteínas diferenciales entre la fase aguda y la basal, de las cuales 83 aumentan y 16 disminuyen durante la reacción.
5. Las proteínas CDC42, S100A9 y Ficolina 2 aumentan en las VEs de la fase aguda y se postulan como posibles biomarcadores de anafilaxia.
6. El estudio de la función coordinada del panel de 99 proteínas diferenciales de las VEs destaca su implicación en la respuesta inmunológica, así como en otros mecanismos moleculares propios de la anafilaxia.
7. Los monocitos son la población de PBMCs que capta mayoritariamente las VEs de los pacientes con anafilaxia.
8. Las VEs de los pacientes con anafilaxia son internalizadas por las CEs y causan un aumento de la permeabilidad endotelial. Además, las de la fase aguda inducen un incremento de este proceso respecto a las de la basal.
9. Los niños con anafilaxia por alimentos presentan un perfil diferencial de 41 miARNs séricos circulantes entre la fase aguda y la basal, de los cuales 21 aumentan y 20 disminuyen durante la reacción.
10. El miR-21-3p y el miR-487b-3p aumentan en los niños con anafilaxia por alimentos postulándose como biomarcadores de la reacción. A su vez, el miR-21-3p se eleva en las VEs de la fase aguda.
11. Los adultos con anafilaxia por medicamentos presentan un perfil diferencial de 21 miARNs séricos circulantes entre la fase aguda y la basal, de los cuales 7 aumentan y 14 disminuyen durante la reacción.
12. El miR-375-3p desciende en el suero y en las VEs de los pacientes con anafilaxia, proponiéndose como un posible biomarcador de la reacción.
13. Los SBA del miR-21-3p, miR-487b-3p y miR-375-3p indican una participación de estas moléculas en la regulación de procesos asociados a la inflamación y a las alteraciones de los órganos. Además, estos miARNs se relacionan con la fisiopatología cardiovascular de la anafilaxia, ya que modulan la permeabilidad endotelial y el tono vascular.
14. Las CEs aumentan los niveles intracelulares del miR-21-3p y contribuyen a la liberación de dicho miARN al medio extracelular en condiciones de anafilaxia *in vitro*.
15. El aumento del miR-375-3p en las CEs bloquea parcialmente la estabilización de la barrera endotelial mediada por AMPc.



9. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Considering baseline serum tryptase values in patients with anaphylaxis improves its sensitivity and specificity in the diagnosis of the reaction.
2. Serum protein concentration and HSA levels decrease in patients with anaphylaxis according to the severity of the reaction, allowing indirect quantification of the vascular extravasation underlying this pathological event and being proposed as potential biomarkers. In addition, HSA supplementation is postulated as a new therapeutic strategy.
3. HBB increases in serum of patients with hypersensitivity events independently of the severity of the reaction.
4. EVs of patients with anaphylaxis exhibit a profile of 99 differential proteins between the acute and basal phase, of which 83 increase and 16 decrease during the reaction.
5. CDC42, S100A9 and Ficolin 2 proteins are increased in EVs of the acute phase and are postulated as potential biomarkers of anaphylaxis.
6. The coordinated function study from the panel of 99 differential EV proteins highlights their involvement in the immune response, as well as in other molecular mechanisms characteristic of anaphylaxis.
7. Monocytes are the PBMCs population that mainly capture EVs from patients with anaphylaxis.
8. EVs from patients with anaphylaxis are internalized by ECs and cause an increase in endothelial permeability. In addition, those of the acute phase induce an increment of this process with respect to those of the basal phase.
9. Children with food anaphylaxis present a differential profile of 41 circulating serum miRNAs between the acute and basal phase, of which 21 increase and 20 decrease during the reaction.
10. Both miR-21-3p and miR-487b-3p are elevated in children with food anaphylaxis, postulating them as biomarkers of the reaction. In turn, miR-21-3p is increased in EVs of the acute phase.
11. Adults with drug-induced anaphylaxis have a differential profile of 21 circulating serum miRNAs between the acute and basal phase, of which 7 increase and 14 decrease during the reaction.
12. The miR-375-3p drops in serum and EVs of patients with anaphylaxis, being proposed as a potential biomarker of the reaction.
13. SBA of miR-21-3p, miR-487b-3p and miR-375-3p indicate an involvement of these molecules in the regulation of processes associated with inflammation and organ alterations. Furthermore, these miRNAs are related to the cardiovascular pathophysiology of anaphylaxis, as they modulate both endothelial permeability and vascular tone.
14. ECs increase intracellular levels of miR-21-3p and contribute to its release into the extracellular medium under conditions of anaphylaxis *in vitro*.
15. The increase of miR-375-3p in ECs partially blocks the stabilization of the endothelial barrier mediated by cAMP.



10. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Cardona, V. *et al.* World allergy organization anaphylaxis guidance 2020. *World Allergy Organ. J.* 13, 100472 (2020).
2. Fischer, D., Vander Leek, T. K., Ellis, A. K. & Kim, H. Anaphylaxis. *Allergy Asthma Clin. Immunol. Off. J. Can. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 14, 54 (2018).
3. Castells, M. Diagnosis and management of anaphylaxis in precision medicine. *J. Allergy Clin. Immunol.* 140, 321–333 (2017).
4. Braganza, S. C., Acworth, J. P., Mckinnon, D. R. L., Peake, J. E. & Brown, A. F. T. Paediatric emergency department anaphylaxis: different patterns from adults. *Arch. Dis. Child.* 91, 159–163 (2006).
5. Simons, F. E. R. *et al.* World allergy organization guidelines for the assessment and management of anaphylaxis. *World Allergy Organ. J.* 4, 13–37 (2011).
6. Yu, J. E. & Lin, R. Y. The Epidemiology of Anaphylaxis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 54, 366–374 (2018).
7. Fromer, L. Prevention of Anaphylaxis: The Role of the Epinephrine Auto-Injector. *Am. J. Med.* 129, 1244–1250 (2016).
8. Bilaver, L. A., Chadha, A. S., Doshi, P., O'Dwyer, L. & Gupta, R. S. Economic burden of food allergy: A systematic review. *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* 122, 373-380.e1 (2019).
9. Patel, D. A., Holdford, D. A., Edwards, E. & Carroll, N. V. Estimating the economic burden of food-induced allergic reactions and anaphylaxis in the United States. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128, 110-115.e5 (2011).
10. De Martinis, M., Sirufo, M. M., Suppa, M. & Ginaldi, L. New Perspectives in Food Allergy. *Int. J. Mol. Sci.* 21, E1474 (2020).
11. Zhou, L. *et al.* Drug allergies documented in electronic health records of a large healthcare system. *Allergy* 71, 1305–1313 (2016).
12. Tejedor-Alonso M A, Moro-Moro, M. & Múgica-García, M. V. Epidemiology of Anaphylaxis: Contributions From the Last 10 Years. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 25, 163–175; quiz follow 174-175 (2015).
13. Regateiro, F. S., Marques, M. L. & Gomes, E. R. Drug-Induced Anaphylaxis: An Update on Epidemiology and Risk Factors. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 181, 481–487 (2020).
14. Tanno, L. K. *et al.* Critical view of anaphylaxis epidemiology: open questions and new perspectives. *Allergy Asthma Clin. Immunol. Off. J. Can. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 14, 12 (2018).
15. Reber, L. L., Hernandez, J. D. & Galli, S. J. The pathophysiology of anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 140, 335–348 (2017).
16. Elieh Ali Komi, D., Wöhrle, S. & Bielory, L. Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 58, 342–365 (2020).
17. Kemp, S. F. & Lockey, R. F. Anaphylaxis: a review of causes and mechanisms. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110, 341–348 (2002).
18. Khan, B. Q. & Kemp, S. F. Pathophysiology of anaphylaxis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 11, 319–325 (2011).
19. Ogawa, Y. & Grant, J. A. Mediators of anaphylaxis. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 27, 249–260, vii (2007).
20. Platzer, B., Stout, M. & Fiebiger, E. Functions of dendritic-cell-bound IgE in allergy. *Mol. Immunol.* 68, 116–119 (2015).
21. Simons, F. E. R. *et al.* Risk assessment in anaphylaxis: current and future approaches. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, S2-24 (2007).
22. Golden, D. B. K., Tracy, J. M., Freeman, T. M., Hoffman, D. R., & Insect Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. Negative venom skin test results in patients with histories of systemic reaction to a sting. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112, 495–498 (2003).
23. Hoffman, D. R. Fatal reactions to hymenoptera stings. *Allergy Asthma Proc.* 24, 123–127 (2003).
24. Finkelman, F. D., Khodoun, M. V. & Strait, R. Human IgE-independent systemic anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 1674–1680 (2016).
25. Muñoz-Cano, R., Picado, C., Valero, A. & Bartra, J. Mechanisms of Anaphylaxis Beyond IgE. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 26, 73–82; quiz 2p following 83 (2016).
26. Cianferoni, A. Non-IgE-mediated anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 147, 1123–1131 (2021).

BIBLIOGRAFÍA

27. Jimenez-Rodriguez, T. W., Garcia-Neuer, M., Alenazy, L. A. & Castells, M. Anaphylaxis in the 21st century: phenotypes, endotypes, and biomarkers. *J. Asthma Allergy* 11, 121–142 (2018).
28. Gillis, C. M. *et al.* Mechanisms of anaphylaxis in human low-affinity IgG receptor locus knock-in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 1253–1265.e14 (2017).
29. Galli, S. J. & Franco, C. B. Basophils are back! *Immunity* 28, 495–497 (2008).
30. Karasuyama, H., Tsujimura, Y., Obata, K. & Mukai, K. Role for basophils in systemic anaphylaxis. *Chem. Immunol. Allergy* 95, 85–97 (2010).
31. Kow, A. S. F. *et al.* Identification of Soluble Mediators in IgG-Mediated Anaphylaxis via Fcγ Receptor: A Meta-Analysis. *Front. Immunol.* 10, 190 (2019).
32. Escribese, M. M. *et al.* Alternative Anaphylactic Routes: The Potential Role of Macrophages. *Front. Immunol.* 8, 515 (2017).
33. Jiao, D. *et al.* Macrophages are the dominant effector cells responsible for IgG-mediated passive systemic anaphylaxis challenged by natural protein antigen in BALB/c and C57BL/6 mice. *Cell. Immunol.* 289, 97–105 (2014).
34. Jönsson, F. *et al.* Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J. Clin. Invest.* 121, 1484–1496 (2011).
35. Jönsson, F., Mancardi, D. A., Albanesi, M. & Bruhns, P. Neutrophils in local and systemic antibody-dependent inflammatory and anaphylactic reactions. *J. Leukoc. Biol.* 94, 643–656 (2013).
36. Francis, A. *et al.* Neutrophil activation during acute human anaphylaxis: analysis of MPO and sCD62L. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 47, 361–370 (2017).
37. Jönsson, F. *et al.* An IgG-induced neutrophil activation pathway contributes to human drug-induced anaphylaxis. *Sci. Transl. Med.* 11, eaat1479 (2019).
38. Spoerl, D., Nigolian, H., Czarnetzki, C. & Harr, T. Reclassifying Anaphylaxis to Neuromuscular Blocking Agents Based on the Presumed Patho-Mechanism: IgE-Mediated, Pharmacological Adverse Reaction or ‘Innate Hypersensitivity’? *Int. J. Mol. Sci.* 18, E1223 (2017).
39. Subramanian, H., Gupta, K. & Ali, H. Roles of Mas-related G protein-coupled receptor X2 on mast cell-mediated host defense, pseudoallergic drug reactions, and chronic inflammatory diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 700–710 (2016).
40. Lieberman, P. & Garvey, L. H. Mast Cells and Anaphylaxis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 16, 20 (2016).
41. Ali, H. Revisiting the role of MRGPRX2 on hypersensitivity reactions to neuromuscular blocking drugs. *Curr. Opin. Immunol.* 72, 65–71 (2021).
42. Montañez, M. I. *et al.* Epidemiology, Mechanisms, and Diagnosis of Drug-Induced Anaphylaxis. *Front. Immunol.* 8, 614 (2017).
43. Sala-Cunill, A. *et al.* Usefulness and limitations of sequential serum tryptase for the diagnosis of anaphylaxis in 102 patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 160, 192–199 (2013).
44. Dua, S. *et al.* Diagnostic Value of Tryptase in Food Allergic Reactions: A Prospective Study of 160 Adult Peanut Challenges. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 6, 1692–1698.e1 (2018).
45. Platzgummer, S. *et al.* Recommendations for the Use of Tryptase in the Diagnosis of Anaphylaxis and Clonal Mastcell Disorders. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* 52, 51–61 (2020).
46. Vitte, J. *et al.* Use and Interpretation of Acute and Baseline Tryptase in Perioperative Hypersensitivity and Anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 9, 2994–3005 (2021).
47. Valent, P. *et al.* Proposed Diagnostic Algorithm for Patients with Suspected Mast Cell Activation Syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 7, 1125–1133.e1 (2019).
48. Borer-Reinhold, M. *et al.* An increase in serum tryptase even below 11.4 ng/mL may indicate a mast cell-mediated hypersensitivity reaction: a prospective study in Hymenoptera venom allergic patients. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 41, 1777–1783 (2011).
49. Hogan, A. D. & Schwartz, L. B. Markers of mast cell degranulation. *Methods San Diego Calif* 13, 43–52 (1997).
50. Vadas, P., Perelman, B. & Liss, G. Platelet-activating factor, histamine, and tryptase levels in human anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 144–149 (2013).
51. Kemp, S. F., Lockey, R. F., Simons, F. E. R., & World Allergy Organization ad hoc Committee on Epinephrine in Anaphylaxis. Epinephrine: the drug of choice for anaphylaxis—a statement of the world allergy organization. *World Allergy Organ. J.* 1, S18–26 (2008).
52. Simons, F. E. R. *et al.* 2015 update of the evidence base: World Allergy Organization anaphylaxis guidelines. *World Allergy Organ. J.* 8, 32 (2015).

BIBLIOGRAFÍA

53. Ring, J., Klimek, L. & Worm, M. Adrenaline in the Acute Treatment of Anaphylaxis. *Dtsch. Arzteblatt Int.* 115, 528–534 (2018).
54. Lieberman, P. & Simons, F. E. R. Anaphylaxis and cardiovascular disease: therapeutic dilemmas. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 45, 1288–1295 (2015).
55. Spindler, V. & Waschke, J. Beta-adrenergic stimulation contributes to maintenance of endothelial barrier functions under baseline conditions. *Microcirc. N. Y. N 1994* 18, 118–127 (2011).
56. Motiejunaite, J., Amar, L. & Vidal-Petiot, E. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. *Ann. Endocrinol.* 82, 193–197 (2021).
57. Simons, F. E. R. First-aid treatment of anaphylaxis to food: focus on epinephrine. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 837–844 (2004).
58. Kemp, A. M. & Kemp, S. F. Pharmacotherapy in refractory anaphylaxis: when intramuscular epinephrine fails. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 14, 371–378 (2014).
59. Muraro, A. *et al.* Anaphylaxis: guidelines from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* 69, 1026–1045 (2014).
60. McCartney, S. L., Duce, L. & Ghadimi, K. Intraoperative vasoplegia: methylene blue to the rescue! *Curr. Opin. Anaesthesiol.* 31, 43–49 (2018).
61. Arias, K. *et al.* Concurrent blockade of platelet-activating factor and histamine prevents life-threatening peanut-induced anaphylactic reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 307–314, 314.e1–2 (2009).
62. Taylor, A. M. & Bordoni, B. Histology, Blood Vascular System. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2022).
63. Tucker, W. D., Arora, Y. & Mahajan, K. Anatomy, Blood Vessels. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2022).
64. Nuñez-Borque, E., Fernandez-Bravo, S., Yuste-Montalvo, A. & Esteban, V. Pathophysiological, Cellular, and Molecular Events of the Vascular System in Anaphylaxis. *Front. Immunol.* 13, 836222 (2022).
65. Monahan-Earley, R., Dvorak, A. M. & Aird, W. C. Evolutionary origins of the blood vascular system and endothelium. *J. Thromb. Haemost. JTH* 11 Suppl 1, 46–66 (2013).
66. Martínez-Fernández, P. *et al.* Medical and pathologic characteristics of fatal anaphylaxis: a Spanish nationwide 17-year series. *Forensic Sci. Med. Pathol.* 15, 369–381 (2019).
67. Mullins, R. J., Wainstein, B. K., Barnes, E. H., Liew, W. K. & Campbell, D. E. Increases in anaphylaxis fatalities in Australia from 1997 to 2013. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 46, 1099–1110 (2016).
68. Turner, P. J. *et al.* Fatal Anaphylaxis: Mortality Rate and Risk Factors. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 5, 1169–1178 (2017).
69. Simons, F. E. R. Anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S161–181 (2010).
70. Jourde-Chiche, N. *et al.* Endothelium structure and function in kidney health and disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 15, 87–108 (2019).
71. Radeva, M. Y. & Waschke, J. Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 222, (2018).
72. Spindler, V., Schlegel, N. & Waschke, J. Role of GTPases in control of microvascular permeability. *Cardiovasc. Res.* 87, 243–253 (2010).
73. Dejana, E. & Orsenigo, F. Endothelial adherens junctions at a glance. *J. Cell Sci.* 126, 2545–2549 (2013).
74. Vestweber, D., Winderlich, M., Cagna, G. & Nottebaum, A. F. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends Cell Biol.* 19, 8–15 (2009).
75. Rafii, S., Butler, J. M. & Ding, B.-S. Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nature* 529, 316–325 (2016).
76. Schmaier, A. H. The contact activation and kallikrein/kinin systems: pathophysiologic and physiologic activities. *J. Thromb. Haemost. JTH* 14, 28–39 (2016).
77. Aird, W. C. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006429 (2012).
78. Rajendran, P. *et al.* The vascular endothelium and human diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 1057–1069 (2013).
79. Barton, M., Baretella, O. & Meyer, M. R. Obesity and risk of vascular disease: importance of endothelium-dependent vasoconstriction. *Br. J. Pharmacol.* 165, 591–602 (2012).
80. Bucci, T., Parente, R., De Feo, G., Cardamone, C. & Triggiani, M. Flow-mediated dilation shows impaired endothelial function in patients with mastocytosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 144, 1106–1111 (2019).

BIBLIOGRAFÍA

81. Guilarte, M., Sala-Cunill, A., Luengo, O., Labrador-Horrillo, M. & Cardona, V. The Mast Cell, Contact, and Coagulation System Connection in Anaphylaxis. *Front. Immunol.* 8, 846 (2017).
82. Yuste-Montalvo, A. *et al.* Proteomic and Biological Analysis of an In Vitro Human Endothelial System in Response to Drug Anaphylaxis. *Front. Immunol.* 12, 692569 (2021).
83. Sala-Cunill, A. *et al.* Plasma contact system activation drives anaphylaxis in severe mast cell-mediated allergic reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 1031-1043.e6 (2015).
84. Jambusaria, A. *et al.* Endothelial heterogeneity across distinct vascular beds during homeostasis and inflammation. *eLife* 9, e51413 (2020).
85. Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.* 100, 158–173 (2007).
86. Heltianu, C., Simionescu, M. & Simionescu, N. Histamine receptors of the microvascular endothelium revealed in situ with a histamine-ferritin conjugate: characteristic high-affinity binding sites in venules. *J. Cell Biol.* 93, 357–364 (1982).
87. Uhlig, S. *et al.* Differential regulation of lung endothelial permeability in vitro and in situ. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 34, 1–19 (2014).
88. Michel, C. C. & Curry, F. E. Microvascular permeability. *Physiol. Rev.* 79, 703–761 (1999).
89. Mehta, D. & Malik, A. B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.* 86, 279–367 (2006).
90. Godo, S. & Shimokawa, H. Endothelial Functions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, e108–e114 (2017).
91. Cyr, A. R., Huckaby, L. V., Shiva, S. S. & Zuckerbraun, B. S. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit. Care Clin.* 36, 307–321 (2020).
92. Hatakeyama, T. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase regulates microvascular hyperpermeability in vivo. *J. Physiol.* 574, 275–281 (2006).
93. Durán, W. N., Breslin, J. W. & Sánchez, F. A. The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability. *Cardiovasc. Res.* 87, 254–261 (2010).
94. Libby, P. & Lüscher, T. COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. *Eur. Heart J.* 41, 3038–3044 (2020).
95. Nguyen, S. M. T. *et al.* Mechanisms Governing Anaphylaxis: Inflammatory Cells, Mediators, Endothelial Gap Junctions and Beyond. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 7785 (2021).
96. Callesen, K. T., Yuste-Montalvo, A., Poulsen, L. K., Jensen, B. M. & Esteban, V. In Vitro Investigation of Vascular Permeability in Endothelial Cells from Human Artery, Vein and Lung Microvessels at Steady-State and Anaphylactic Conditions. *Biomedicines* 9, 439 (2021).
97. Dribin, T. E. *et al.* Severity grading system for acute allergic reactions: A multidisciplinary Delphi study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 148, 173–181 (2021).
98. Fisher, M. M. Clinical observations on the pathophysiology and treatment of anaphylactic cardiovascular collapse. *Anaesth. Intensive Care* 14, 17–21 (1986).
99. Smith, P. L. *et al.* Physiologic manifestations of human anaphylaxis. *J. Clin. Invest.* 66, 1072–1080 (1980).
100. Bochaton-Piallat, M.-L. & Bäck, M. Novel concepts for the role of smooth muscle cells in vascular disease: towards a new smooth muscle cell classification. *Cardiovasc. Res.* 114, 477–480 (2018).
101. Kounis, N. G. *et al.* Anaphylactic cardiovascular collapse and Kounis syndrome: systemic vasodilation or coronary vasoconstriction? *Ann. Transl. Med.* 6, 332 (2018).
102. Felix, S. B., Baumann, G. & Berdel, W. E. Systemic anaphylaxis--separation of cardiac reactions from respiratory and peripheral vascular events. *Res. Exp. Med. Z. Gesamte Exp. Med. Einschl. Exp. Chir.* 190, 239–252 (1990).
103. Ebo, D. G. *et al.* Molecular mechanisms and pathophysiology of perioperative hypersensitivity and anaphylaxis: a narrative review. *Br. J. Anaesth.* 123, e38–e49 (2019).
104. Brown, S. G. A. Cardiovascular aspects of anaphylaxis: implications for treatment and diagnosis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 5, 359–364 (2005).
105. Brown, S. G. A. The pathophysiology of shock in anaphylaxis. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 27, 165–175, v (2007).
106. LoVerde, D., Iweala, O. I., Eginli, A. & Krishnaswamy, G. Anaphylaxis. *Chest* 153, 528–543 (2018).
107. Schadt, J. C. & Ludbrook, J. Hemodynamic and neurohumoral responses to acute hypovolemia in conscious mammals. *Am. J. Physiol.* 260, H305-318 (1991).

BIBLIOGRAFÍA

108. Fisher, M. Blood volume replacement in acute anaphylactic cardiovascular collapse related to anaesthesia. *Br. J. Anaesth.* 49, 1023–1026 (1977).
109. Egawa, G. *et al.* Intravital analysis of vascular permeability in mice using two-photon microscopy. *Sci. Rep.* 3, 1932 (2013).
110. Pugsley, M. K. & Tabrizchi, R. The vascular system. An overview of structure and function. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 44, 333–340 (2000).
111. Claesson-Welsh, L., Dejana, E. & McDonald, D. M. Permeability of the Endothelial Barrier: Identifying and Reconciling Controversies. *Trends Mol. Med.* 27, 314–331 (2021).
112. Michel, C. C., Woodcock, T. E. & Curry, F.-R. E. Understanding and extending the Starling principle. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 64, 1032–1037 (2020).
113. Erstad, B. L. The Revised Starling Equation: The Debate of Albumin Versus Crystalloids Continues. *Ann. Pharmacother.* 54, 921–927 (2020).
114. Anderson, N. L. *et al.* The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 3, 311–326 (2004).
115. James, L. P. & Austen, K. F. FATAL SYSTEMIC ANAPHYLAXIS IN MAN. *N. Engl. J. Med.* 270, 597–603 (1964).
116. Sonin, L., Grammer, L. C., Greenberger, P. A. & Patterson, R. Idiopathic anaphylaxis: a clinical summary. *Ann. Intern. Med.* 99, 634–635 (1983).
117. Barthel, G. *et al.* Biphasic airway-lung response to anaphylactic shock in Brown Norway rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 189, 47–51 (2013).
118. Miller, R. L., Shtessel, M., Robinson, L. B. & Banerji, A. Advances in drug allergy, urticaria, angioedema, and anaphylaxis in 2018. *J. Allergy Clin. Immunol.* 144, 381–392 (2019).
119. Shirai, T., Mori, M., Uotani, T. & Chida, K. Gastrointestinal disorders in anaphylaxis. *Intern. Med. Tokyo Jpn.* 46, 315–316 (2007).
120. Kaplan, A. P. Kinins, airway obstruction, and anaphylaxis. *Chem. Immunol. Allergy* 95, 67–84 (2010).
121. Ruiz-Garcia, M. *et al.* Cardiovascular changes during peanut-induced allergic reactions in human subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 147, 633–642 (2021).
122. Jacobsen, R. C. & Gratton, M. C. A case of unrecognized prehospital anaphylactic shock. *Prehosp. Emerg. Care* 15, 61–66 (2011).
123. Simeone, P. *et al.* Extracellular Vesicles as Signaling Mediators and Disease Biomarkers across Biological Barriers. *Int. J. Mol. Sci.* 21, E2514 (2020).
124. Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383 (2013).
125. Manfredi, F., Di Bonito, P., Arenaccio, C., Anticoli, S. & Federico, M. Incorporation of Heterologous Proteins in Engineered Exosomes. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1448, 249–260 (2016).
126. Cañas, J. A., Sastre, B., Rodrigo-Muñoz, J. M. & Del Pozo, V. Exosomes: A new approach to asthma pathology. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 495, 139–147 (2019).
127. Urabe, F. *et al.* Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 318, C29–C39 (2020).
128. Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S. & Chen, C. C. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neurooncol.* 113, 1–11 (2013).
129. Simpson, R. J., Lim, J. W., Moritz, R. L. & Mathivanan, S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev. Proteomics* 6, 267–283 (2009).
130. Mathivanan, S., Ji, H. & Simpson, R. J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics* 73, 1907–1920 (2010).
131. Théry, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 569–579 (2002).
132. Müller, G. Microvesicles/exosomes as potential novel biomarkers of metabolic diseases. *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* 5, 247–282 (2012).
133. Keller, S., Sanderson, M. P., Stoeck, A. & Altevogt, P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol. Lett.* 107, 102–108 (2006).
134. Tricarico, C., Clancy, J. & D’Souza-Schorey, C. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases* 8, 220–232 (2017).

BIBLIOGRAFÍA

135. Carretero-González, A., Otero, I., Carril-Ajuria, L., de Velasco, G. & Manso, L. Exosomes: Definition, Role in Tumor Development and Clinical Implications. *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.* 11, 13–21 (2018).
136. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257 (1972).
137. Coleman, M. L. *et al.* Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* 3, 339–345 (2001).
138. Sebbagh, M. *et al.* Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat. Cell Biol.* 3, 346–352 (2001).
139. Asare-Werehene, M. *et al.* The exosome-mediated autocrine and paracrine actions of plasma gelsolin in ovarian cancer chemoresistance. *Oncogene* 39, 1600–1616 (2020).
140. Hessvik, N. P. & Llorente, A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 75, 193–208 (2018).
141. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659 (2007).
142. Ludwig, A.-K. & Giebel, B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 11–15 (2012).
143. Saint-Pol, J., Gosselet, F., Duban-Deweer, S., Pottiez, G. & Karamanos, Y. Targeting and Crossing the Blood-Brain Barrier with Extracellular Vesicles. *Cells* 9, E851 (2020).
144. Morad, G. *et al.* Tumor-Derived Extracellular Vesicles Breach the Intact Blood-Brain Barrier via Transcytosis. *ACS Nano* 13, 13853–13865 (2019).
145. Seibold, T., Waldenmaier, M., Seufferlein, T. & Eiseler, T. Small Extracellular Vesicles and Metastasis-Blame the Messenger. *Cancers* 13, 4380 (2021).
146. Farcas, M. & Inngjerdigen, M. Natural killer cell-derived extracellular vesicles in cancer therapy. *Scand. J. Immunol.* 92, e12938 (2020).
147. Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic Cph. Den.* 12, 1659–1668 (2011).
148. Admyre, C. *et al.* Exosomes - nanovesicles with possible roles in allergic inflammation. *Allergy* 63, 404–408 (2008).
149. Shefler, I., Salamon, P., Reshef, T., Mor, A. & Mekori, Y. A. T cell-induced mast cell activation: a role for microparticles released from activated T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 4206–4212 (2010).
150. Admyre, C. *et al.* B cell-derived exosomes can present allergen peptides and activate allergen-specific T cells to proliferate and produce TH2-like cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 1418–1424 (2007).
151. Sastre, B., Cañas, J. A., Rodrigo-Muñoz, J. M. & Del Pozo, V. Novel Modulators of Asthma and Allergy: Exosomes and MicroRNAs. *Front. Immunol.* 8, 826 (2017).
152. Xia, Y. C., Harris, T., Stewart, A. G. & Mackay, G. A. Secreted factors from human mast cells trigger inflammatory cytokine production by human airway smooth muscle cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 160, 75–85 (2013).
153. Xie, G. *et al.* Mast cell exosomes can suppress allergic reactions by binding to IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 788–791 (2018).
154. Sheridan, C. Exosome cancer diagnostic reaches market. *Nat. Biotechnol.* 34, 359–360 (2016).
155. De Toro, J., Herschlik, L., Waldner, C. & Mongini, C. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front. Immunol.* 6, 203 (2015).
156. Cai, Y., Yu, X., Hu, S. & Yu, J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 7, 147–154 (2009).
157. Lin, S. & Gregory, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 15, 321–333 (2015).
158. Yang, Z. *et al.* dbDEMOC 2.0: updated database of differentially expressed miRNAs in human cancers. *Nucleic Acids Res.* 45, D812–D818 (2017).
159. Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D. & Galas, D. J. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 38, 7248–7259 (2010).
160. Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A. & Burwinkel, B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* 39, 7223–7233 (2011).
161. Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I. & Illei, G. G. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One* 7, e30679 (2012).

BIBLIOGRAFÍA

162. Jiang, Q. *et al.* Prioritization of disease microRNAs through a human phenome-microRNAome network. *BMC Syst. Biol.* 4 Suppl 1, S2 (2010).
163. Backes, C., Meese, E. & Keller, A. Specific miRNA Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects. *Mol. Diagn. Ther.* 20, 509–518 (2016).
164. Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S. & Ghaffari, S. H. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J. Cell. Physiol.* 234, 5451–5465 (2019).
165. Hammond, S. M. An overview of microRNAs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 87, 3–14 (2015).
166. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 509–524 (2014).
167. Lee, H., Han, S., Kwon, C. S. & Lee, D. Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein Cell* 7, 100–113 (2016).
168. Specjalski, K. & Jassem, E. MicroRNAs: Potential Biomarkers and Targets of Therapy in Allergic Diseases? *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 67, 213–223 (2019).
169. Kwon, Y. *et al.* MicroRNA-26a/-26b-COX-2-MIP-2 Loop Regulates Allergic Inflammation and Allergic Inflammation-promoted Enhanced Tumorigenic and Metastatic Potential of Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 290, 14245–14266 (2015).
170. Biethahn, K. *et al.* miRNA-155 controls mast cell activation by regulating the PI3K γ pathway and anaphylaxis in a mouse model. *Allergy* 69, 752–762 (2014).
171. Bao, Y. *et al.* MicroRNA-126 accelerates IgE-mediated mast cell degranulation associated with the PI3K/Akt signaling pathway by promoting Ca²⁺ influx. *Exp. Ther. Med.* 16, 2763–2769 (2018).
172. Kim, M. *et al.* MiR-135-5p-p62 Axis Regulates Autophagic Flux, Tumorigenic Potential, and Cellular Interactions Mediated by Extracellular Vesicles During Allergic Inflammation. *Front. Immunol.* 10, 738 (2019).
173. Kim, M. *et al.* MiR-154-5p-MCP1 Axis Regulates Allergic Inflammation by Mediating Cellular Interactions. *Front. Immunol.* 12, 663726 (2021).
174. Kwon, Y. *et al.* EGR3-HDAC6-IL-27 Axis Mediates Allergic Inflammation and Is Necessary for Tumorigenic Potential of Cancer Cells Enhanced by Allergic Inflammation-Promoted Cellular Interactions. *Front. Immunol.* 12, 680441 (2021).
175. Eom, S. *et al.* Transglutaminase II/microRNA-218/-181a loop regulates positive feedback relationship between allergic inflammation and tumor metastasis. *J. Biol. Chem.* 289, 29483–29505 (2014).
176. Noh, K. *et al.* miR-122-SOCS1-JAK2 axis regulates allergic inflammation and allergic inflammation-promoted cellular interactions. *Oncotarget* 8, 63155–63176 (2017).
177. Wang, J., Chen, J. & Sen, S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J. Cell. Physiol.* 231, 25–30 (2016).
178. Huang, W. MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1617, 57–67 (2017).
179. Chau, C. H., Strobe, J. D. & Figg, W. D. COVID-19 Clinical Diagnostics and Testing Technology. *Pharmacotherapy* 40, 857–868 (2020).
180. Panganiban, R. P. *et al.* Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 1423–1432 (2016).
181. Jia, M., Chu, C. & Wang, M. Correlation of microRNA profiles with disease risk and severity of allergic rhinitis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 11, 1791–1802 (2018).
182. Rodrigo-Muñoz, J. M. *et al.* Asthma diagnosis using integrated analysis of eosinophil microRNAs. *Allergy* 74, 507–517 (2019).
183. Brown, S. G. A. Clinical features and severity grading of anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 371–376 (2004).
184. Sampson, H. A. *et al.* Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report--Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 391–397 (2006).
185. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254 (1976).
186. Albar, J. P., Juarez, C., Vivanco-Martínez, F., Bragado, R. & Ortíz, F. Structural requirements of rabbit IgG F(ab')₂ fragment for activation of the complement system through the alternative pathway--I. Disulfide bonds. *Mol. Immunol.* 18, 925–934 (1981).

BIBLIOGRAFÍA

187. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675 (2012).
188. Sechi, S. A method to identify and simultaneously determine the relative quantities of proteins isolated by gel electrophoresis. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* 16, 1416–1424 (2002).
189. Théry, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* 7, 1535750 (2018).
190. Rao, X., Huang, X., Zhou, Z. & Lin, X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat. Bioinforma. Biomath.* 3, 71–85 (2013).
191. Chen, Y. & Wang, X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 48, D127–D131 (2020).
192. Metsalu, T. & Vilo, J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* 43, W566–570 (2015).
193. Pham, T. V., Piersma, S. R., Warmoes, M. & Jimenez, C. R. On the beta-binomial model for analysis of spectral count data in label-free tandem mass spectrometry-based proteomics. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 363–369 (2010).
194. Ballman, K. V., Grill, D. E., Oberg, A. L. & Therneau, T. M. Faster cyclic loess: normalizing RNA arrays via linear models. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 20, 2778–2786 (2004).
195. Elo, L. L., Filen, S., Lahesmaa, R. & Aittokallio, T. Reproducibility-optimized test statistic for ranking genes in microarray studies. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* 5, 423–431 (2008).
196. Zinkevich, O. D., Litvinov, R. I., Zubairov, D. M. & Kuravskaja, M. S. [Interaction of fibronectin with polymorphonuclear leukocytes normally and in anaphylaxis]. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 102, 449–452 (1986).
197. Zubairova, L. D., Zinkevich, O. D. & Litvinov, R. I. [Interaction of alveolar macrophages with fibronectin during sensitization and anaphylactic shock]. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 100, 336–339 (1985).
198. Sinniah, A. *et al.* Endogenous Annexin-A1 Negatively Regulates Mast Cell-Mediated Allergic Reactions. *Front. Pharmacol.* 10, 1313 (2019).
199. Palosuo, K. *et al.* Transglutaminase-mediated cross-linking of a peptic fraction of omega-5 gliadin enhances IgE reactivity in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 1386–1392 (2003).
200. Kim, Y. *et al.* Transglutaminase II interacts with rac1, regulates production of reactive oxygen species, expression of snail, secretion of Th2 cytokines and mediates in vitro and in vivo allergic inflammation. *Mol. Immunol.* 47, 1010–1022 (2010).
201. Zhang, R. *et al.* Treatment of lipoid proteinosis due to the p.C220G mutation in ECM1, a major allele in Chinese patients. *J. Transl. Med.* 12, 85 (2014).
202. Farhat, E., Tegg, E., Mohammed, S., Grzechnik, E. & Favaloro, E. J. Not as sweet as honey: A rare case of an apparent factor V ‘inhibitor’ in association with bee sting anaphylaxis. *Am. J. Hematol.* 93, 965–970 (2018).
203. Coppola, A. *et al.* Management of patients with factor V deficiency: open issues from the challenging history of a woman with anaphylactic transfusion reactions. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 16, 560–563 (2010).
204. Matsuda, K. *et al.* A Rapid Shift from Chronic Hyperoxia to Normoxia Induces Systemic Anaphylaxis via Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channels on Mast Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 205, 2959–2967 (2020).
205. Wong, M.-X., Roberts, D., Bartley, P. A. & Jackson, D. E. Absence of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) leads to increased severity of local and systemic IgE-mediated anaphylaxis and modulation of mast cell activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168, 6455–6462 (2002).
206. Francis, A. *et al.* Markers Involved in Innate Immunity and Neutrophil Activation are Elevated during Acute Human Anaphylaxis: Validation of a Microarray Study. *J. Innate Immun.* 11, 63–73 (2019).
207. Wittenberg, M. *et al.* Serum levels of $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ and apolipoprotein A1 achieve high predictive power as biomarkers of anaphylaxis. *Allergy* 72, 1801–1805 (2017).
208. Aidoo, D. B. *et al.* Allergic Airway-Induced Hypersensitivity Is Attenuated by Bergapten in Murine Models of Inflammation. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2019, 6097349 (2019).
209. McLeod, J. J. A. *et al.* Didox (3,4-dihydroxybenzohydroxamic acid) suppresses IgE-mediated mast cell activation through attenuation of NF κ B and AP-1 transcription. *Cell. Immunol.* 322, 41–48 (2017).

BIBLIOGRAFÍA

210. Mizuno, M. & Nishitani, Y. Macrophage activation-mediated hydrogen peroxide generation by the royal sun medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis* (Higher Basidiomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms* 15, 365–371 (2013).
211. Pettersson, M. E. *et al.* Apolipoprotein B: a possible new biomarker for anaphylaxis. *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* 118, 515–516 (2017).
212. Hobson, D. J. *et al.* Proteomic analysis of ovomucoid hypersensitivity in mice by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 45, 2372–2380 (2007).
213. McManus, L. M., Morley, C. A., Levine, S. P. & Pinckard, R. N. Platelet activating factor (PAF) induced release of platelet factor 4 (PF4) in vitro and during IgE anaphylaxis in the rabbit. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 123, 2835–2841 (1979).
214. Halonen, M., Palmer, J. D., Lohman, I. C., McManus, L. M. & Pinckard, R. N. Respiratory and circulatory alterations induced by acetyl glyceryl ether phosphorylcholine, a mediator of IgE anaphylaxis in the rabbit. *Am. Rev. Respir. Dis.* 122, 915–924 (1980).
215. Ra, C., Yasuda, M., Yagita, H. & Okumura, K. Fibronectin receptor integrins are involved in mast cell activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 94, 625–628 (1994).
216. Mathews, K. P., Pan, P. M., Amendola, M. A. & Lewis, F. H. Plasma protease inhibitor and anaphylatoxin inactivator levels in chronic urticaria/angioedema and in patients experiencing anaphylactoid reactions to radiographic contrast media. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 79, 220–223 (1986).
217. Mackensen, A., Dräger, R., Schlesier, M., Mertelsmann, R. & Lindemann, A. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 49, 152–156 (2000).
218. Moreno Lozano, L. *et al.* Human Serum Albumin Induced Anaphylaxis in a Patient With Good Tolerance to Human Plasma. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 29, 51–53 (2019).
219. Black, W. D. & Gentry, P. A. A study of the effect of acute systemic anaphylaxis on blood coagulation and TAME esterase activity in calves. *Can. J. Comp. Med. Rev. Can. Med. Comp.* 44, 141–147 (1980).
220. Alter, S. C., Kramps, J. A., Janoff, A. & Schwartz, L. B. Interactions of human mast cell tryptase with biological protease inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.* 276, 26–31 (1990).
221. Quintero, S. & Crowle, A. J. Anaphylaxis in the mouse--a model for using two-dimensional electroimmunodiffusion to study pathological changes in multiple serum proteins simultaneously. *Clin. Chem.* 25, 723–728 (1979).
222. McNamara, P. J., Brouwer, K. R. & Gillespie, M. N. Autacoid binding to serum proteins. Interaction of platelet activating factor (PAF) with human serum alpha-1-acid glycoprotein (AAG). *Biochem. Pharmacol.* 35, 621–624 (1986).
223. Aleshkin, V. A., Enikeeva, S. A. & Liutov, A. G. [Effect of alpha 1-acid glycoprotein on the development of anaphylactic shock in guinea pigs]. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 15–18 (1986).
224. Lin, R. Y. *et al.* Interleukin 6 and C-reactive protein levels in patients with acute allergic reactions: an emergency department-based study. *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* 87, 412–416 (2001).
225. Nezhinskaia, G. I., Losev, N. A., Nazarov, P. G. & Sapronov, N. S. [Effect of acetylcholine and C-reactive protein on regulation of anaphylactic shock in guinea pigs]. *Eksp. Klin. Farmakol.* 68, 49–52 (2005).
226. Lu, T. X., Munitz, A. & Rothenberg, M. E. MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 4994–5002 (2009).
227. Elbehidy, R. M. *et al.* MicroRNA-21 as a novel biomarker in diagnosis and response to therapy in asthmatic children. *Mol. Immunol.* 71, 107–114 (2016).
228. Vennegaard, M. T. *et al.* Allergic contact dermatitis induces upregulation of identical microRNAs in humans and mice. *Contact Dermatitis* 67, 298–305 (2012).
229. Milger, K. *et al.* Identification of a plasma miRNA biomarker signature for allergic asthma: A translational approach. *Allergy* 72, 1962–1971 (2017).
230. Chen, R. F. *et al.* MicroRNA-21 expression in neonatal blood associated with antenatal immunoglobulin E production and development of allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 40, 1482–1490 (2010).
231. Lu, T. X. *et al.* MicroRNA signature in patients with eosinophilic esophagitis, reversibility with glucocorticoids, and assessment as disease biomarkers. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 1064-1075.e9 (2012).

BIBLIOGRAFÍA

232. Lu, S. *et al.* MicroRNA profiling in mucosal biopsies of eosinophilic esophagitis patients pre and post treatment with steroids and relationship with mRNA targets. *PLoS One* 7, e40676 (2012).
233. Xiao, R., Noël, A., Perveen, Z. & Penn, A. L. In utero exposure to second-hand smoke activates pro-asthmatic and oncogenic miRNAs in adult asthmatic mice. *Environ. Mol. Mutagen.* 57, 190–199 (2016).
234. Kim, R. Y. *et al.* MicroRNA-21 drives severe, steroid-insensitive experimental asthma by amplifying phosphoinositide 3-kinase-mediated suppression of histone deacetylase 2. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 519–532 (2017).
235. Simpson, M. R. *et al.* Human Breast Milk miRNA, Maternal Probiotic Supplementation and Atopic Dermatitis in Offspring. *PLoS One* 10, e0143496 (2015).
236. Tsuru, Y. *et al.* miR-424 levels in hair shaft are increased in psoriatic patients. *J. Dermatol.* 41, 382–385 (2014).
237. Xuan, L. *et al.* MicroRNAs regulating mucin type O-glycan biosynthesis and transforming growth factor β signaling pathways in nasal mucosa of patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps in Northern China. *Int. Forum Allergy Rhinol.* 9, 106–113 (2019).
238. Yamazumi, Y. *et al.* The RNA Binding Protein Mex-3B Is Required for IL-33 Induction in the Development of Allergic Airway Inflammation. *Cell Rep.* 16, 2456–2471 (2016).
239. Liu, H. C., Liao, Y. & Liu, C. Q. miR-487b mitigates allergic rhinitis through inhibition of the IL-33/ST2 signaling pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22, 8076–8083 (2018).
240. Dong, X. *et al.* Regulation of CBL and ESR1 expression by microRNA-22-3p, 513a-5p and 625-5p may impact the pathogenesis of dust mite-induced pediatric asthma. *Int. J. Mol. Med.* 38, 446–456 (2016).
241. Wang, X. *et al.* CircZNF652 promotes the goblet cell metaplasia by targeting the miR-452-5p/JAK2 signaling pathway in allergic airway epithelia. *J. Allergy Clin. Immunol.* 150, 192–203 (2022).
242. Xie, T. *et al.* MicroRNA-127 inhibits lung inflammation by targeting IgG Fc γ receptor I. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 2437–2444 (2012).
243. Zeng, Q., Liu, W., Luo, R. & Lu, G. MicroRNA-181a and microRNA-155 are involved in the regulation of the differentiation and function of regulatory T cells in allergic rhinitis children. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* 30, 434–442 (2019).
244. Liu, W., Ouyang, H., Zeng, Q., Luo, R. & Lu, G. Decreased Treg-derived miR-181a and miR-155 correlated with reduced number and function of Treg cells in allergic rhinitis children. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* 276, 1089–1094 (2019).
245. Liu, W., Zeng, Q. & Luo, R. Correlation between Serum Osteopontin and miR-181a Levels in Allergic Rhinitis Children. *Mediators Inflamm.* 2016, 9471215 (2016).
246. Kärner, J. *et al.* Increased microRNA-323-3p in IL-22/IL-17-producing T cells and asthma: a role in the regulation of the TGF- β pathway and IL-22 production. *Allergy* 72, 55–65 (2017).
247. Lin, J., Feng, X. & Zhang, J. Circular RNA circHIPK3 modulates the proliferation of airway smooth muscle cells by miR-326/STIM1 axis. *Life Sci.* 255, 117835 (2020).
248. Zhang, X. *et al.* The role of miR-29c/B7-H3 axis in children with allergic asthma. *J. Transl. Med.* 16, 218 (2018).
249. Wei, Y. *et al.* Exposure to ozone impacted Th1/Th2 imbalance of CD4+ T cells and apoptosis of ASMCS underlying asthmatic progression by activating lncRNA PVT1-miR-15a-5p/miR-29c-3p signaling. *Aging* 12, 25229–25255 (2020).
250. Mao, Z. *et al.* Transcriptional regulation on the gene expression signature in combined allergic rhinitis and asthma syndrome. *Epigenomics* 10, 119–131 (2018).
251. Wang, Y. *et al.* Circulating microRNA Signatures Associated with Childhood Asthma. *Clin. Lab.* 61, 467–474 (2015).
252. Xu, L., Yi, M., Tan, Y., Yi, Z. & Zhang, Y. A comprehensive analysis of microRNAs as diagnostic biomarkers for asthma. *Ther. Adv. Respir. Dis.* 14, 1753466620981863 (2020).
253. Paone, S., Baxter, A. A., Hulett, M. D. & Poon, I. K. H. Endothelial cell apoptosis and the role of endothelial cell-derived extracellular vesicles in the progression of atherosclerosis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 76, 1093–1106 (2019).
254. Zeng, H. *et al.* Atractylon Treatment Attenuates Pulmonary Fibrosis via Regulation of the mmu_circ_0000981/miR-211-5p/TGFBR2 Axis in an Ovalbumin-Induced Asthma Mouse Model. *Inflammation* 44, 1856–1864 (2021).

BIBLIOGRAFÍA

255. Zhu, H. *et al.* [Yanghe Pingchuan granule promotes BMSCs homing in asthmatic rats by upregulating miR-139-5p and downregulating Notch1/Hes1 pathway]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 40, 1703–1711 (2020).
256. Zhang, H., Sun, Z., Yu, L. & Sun, J. MiR-139-5p inhibits proliferation and promoted apoptosis of human airway smooth muscle cells by downregulating the Brg1 gene. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 246, 9–16 (2017).
257. Quan, L., Ren, G., Liu, L., Huang, W. & Li, M. Circular RNA circ_0002594 regulates PDGF-BB-induced proliferation and migration of human airway smooth muscle cells via sponging miR-139-5p/TRIM8 in asthma. *Autoimmunity* 55, 339–350 (2022).
258. Bao, L. *et al.* Dysregulated microRNA expression in IL-4 transgenic mice, an animal model of atopic dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* 313, 837–846 (2021).
259. Chen, Y. *et al.* Comprehensive analysis of miRNA-mRNA-lncRNA networks in severe asthma. *Epigenomics* 11, 115–131 (2019).
260. Chiba, Y. *et al.* Interleukin-17A directly acts on bronchial smooth muscle cells and augments the contractility. *Pharmacol. Rep. PR* 69, 377–385 (2017).
261. Mendes, F. C. *et al.* Development and validation of exhaled breath condensate microRNAs to identify and endotype asthma in children. *PLoS One* 14, e0224983 (2019).
262. Mendes, F. C. *et al.* Dietary Acid Load Modulation of Asthma-Related miRNAs in the Exhaled Breath Condensate of Children. *Nutrients* 14, 1147 (2022).
263. Bersimbaev, R. *et al.* The Plasma Levels of hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-125b-5p, and hsa-miR-320c in Patients with Asthma, COPD and Asthma-COPD Overlap Syndrome (ACOS). *MicroRNA Shariqah United Arab Emir.* 10, 130–138 (2021).
264. Aripova, A., Akparova, A. & Bersimbaev, R. The Potential Role of miRNA-19b-3p and miRNA-320c in Patients with Moderate Bronchial Asthma. *MicroRNA Shariqah United Arab Emir.* 9, 373–377 (2020).
265. Zhang, S., Lin, S., Tang, Q. & Yan, Z. Knockdown of miR-205-5p alleviates the inflammatory response in allergic rhinitis by targeting B-cell lymphoma 6. *Mol. Med. Rep.* 24, 818 (2021).
266. Kuang, Y. *et al.* Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (PEBP1) mediates the regulatory role of microRNAs (miRNAs)-205-5p in degranulation and histamine release. *Bioengineered* 13, 13341–13351 (2022).
267. Zhang, K. *et al.* Epithelial miR-206 targets CD39/extracellular ATP to upregulate airway IL-25 and TSLP in type 2-high asthma. *JCI Insight* 6, 148103 (2021).
268. Lin, C. C., Law, B. F. & Hettick, J. M. Acute 4,4'-Methylene Diphenyl Diisocyanate Exposure-Mediated Downregulation of miR-206-3p and miR-381-3p Activates Inducible Nitric Oxide Synthase Transcription by Targeting Calcineurin/NFAT Signaling in Macrophages. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 173, 100–113 (2020).
269. Yin, H., Liu, M. H., Gao, F. & Shang, H. M. Pro-inflammatory and pro-fibrotic role of long non-coding RNA RMRP in pediatric asthma through targeting microRNA-206/CCL2 axis. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 35, 71–83 (2021).
270. Wang, L., Xu, J., Liu, H., Li, J. & Hao, H. PM2.5 inhibits SOD1 expression by up-regulating microRNA-206 and promotes ROS accumulation and disease progression in asthmatic mice. *Int. Immunopharmacol.* 76, 105871 (2019).
271. Kho, A. T. *et al.* Circulating microRNAs and prediction of asthma exacerbation in childhood asthma. *Respir. Res.* 19, 128 (2018).
272. Chen, R., Piao, L. Z., Liu, L. & Zhang, X. F. DNA methylation and gene expression profiles to identify childhood atopic asthma associated genes. *BMC Pulm. Med.* 21, 292 (2021).
273. Lin, C. C., Law, B. F. & Hettick, J. M. MicroRNA-mediated calcineurin signaling activation induces CCL2, CCL3, CCL5, IL8, and chemotactic activities in 4,4'-methylene diphenyl diisocyanate exposed macrophages. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* 51, 1436–1452 (2021).
274. Fan, Q. & Jian, Y. MiR-203a-3p regulates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in asthma by regulating Smad3 pathway through SIX1. *Biosci. Rep.* 40, BSR20192645 (2020).
275. Yu, X. *et al.* α -Asarone suppresses the proliferation and migration of ASMCs through targeting the lncRNA-PVT1/miR-203a/E2F3 signal pathway in RSV-infected rats. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 49, 598–608 (2017).
276. Bahmer, T. *et al.* RNA-seq-based profiling of extracellular vesicles in plasma reveals a potential role of miR-122-5p in asthma. *Allergy* 76, 366–371 (2021).

BIBLIOGRAFÍA

277. Luo, X., Zeng, Q., Yan, S., Liu, W. & Luo, R. MicroRNA-375-mediated regulation of ILC2 cells through TSLP in allergic rhinitis. *World Allergy Organ. J.* 13, 100451 (2020).
278. Zhao, L., Shi, X., Wang, N., Liu, C. & Wang, J. YAP1, targeted by miR-375, enhanced the pro-angiogenesis of airway smooth muscle cells in asthma via STAT3 activation. *Cell Cycle Georget. Tex* 19, 1275–1284 (2020).
279. Xu, G., Xie, Q. & Zhou, H. [Changes of serum miR-375 and blood target genes in patients with allergic rhinitis before and after treatment and its significance]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 44, 767–774 (2019).
280. Wang, T., Wang, P., Chen, D., Xu, Z. & Yang, L. circARRDC3 contributes to interleukin-13-induced inflammatory cytokine and mucus production in nasal epithelial cells via the miR-375/KLF4 axis. *Mol. Med. Rep.* 23, 141 (2021).
281. Lu, T. X. *et al.* MiR-375 is downregulated in epithelial cells after IL-13 stimulation and regulates an IL-13-induced epithelial transcriptome. *Mucosal Immunol.* 5, 388–396 (2012).
282. Wang, T., Chen, D., Wang, P., Xu, Z. & Li, Y. miR-375 prevents nasal mucosa cells from apoptosis and ameliorates allergic rhinitis via inhibiting JAK2/STAT3 pathway. *Biomed. Pharmacother. Biomedicine Pharmacother.* 103, 621–627 (2018).
283. Specjalski, K. & Niedoszytko, M. MicroRNAs: future biomarkers and targets of therapy in asthma? *Curr. Opin. Pulm. Med.* 26, 285–292 (2020).
284. Zahm, A. M. *et al.* Pediatric eosinophilic esophagitis is associated with changes in esophageal microRNAs. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 307, G803-812 (2014).
285. Beheshti, R., Halstead, S., McKeone, D. & Hicks, S. D. Understanding immunological origins of atopic dermatitis through multi-omic analysis. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* 33, e13817 (2022).
286. Shen, Y. *et al.* MicroRNA-885-3p alleviates bronchial epithelial cell injury induced by lipopolysaccharide via toll-like receptor 4. *Bioengineered* 13, 5305–5317 (2022).
287. Li, P. H. *et al.* Increasing incidence of anaphylaxis in Hong Kong from 2009 to 2019-discrepancies of anaphylaxis care between adult and paediatric patients. *Clin. Transl. Allergy* 10, 51 (2020).
288. Turner, P. J. *et al.* Increase in anaphylaxis-related hospitalizations but no increase in fatalities: an analysis of United Kingdom national anaphylaxis data, 1992-2012. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 956-963.e1 (2015).
289. Michelson, K. A., Dribin, T. E., Vyles, D. & Neuman, M. I. Trends in emergency care for anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 8, 767-768.e2 (2020).
290. Poulsen, L. K., Jensen, B. M., Esteban, V. & Garvey, L. H. Beyond IgE-When Do IgE-Crosslinking and Effector Cell Activation Lead to Clinical Anaphylaxis? *Front. Immunol.* 8, 871 (2017).
291. Muñoz-Cano, R. *et al.* Mechanisms, Cofactors, and Augmenting Factors Involved in Anaphylaxis. *Front. Immunol.* 8, 1193 (2017).
292. Aronson, J. K. & Ferner, R. E. Biomarkers-A General Review. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 76, 9.23.1-9.23.17 (2017).
293. Hovhannisyán, L., Czechowska, E. & Gutowska-Owsiak, D. The Role of Non-Immune Cell-Derived Extracellular Vesicles in Allergy. *Front. Immunol.* 12, 702381 (2021).
294. Lu, T. X. & Rothenberg, M. E. MicroRNA. *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 1202–1207 (2018).
295. Fernández-Bravo, S. *et al.* Anaphylaxis: mediators, biomarkers and microenvironments. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 0 (2022).
296. van den Blink, B., Wijzenbeek, M. S. & Hoogsteden, H. C. Serum biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 23, 515–520 (2010).
297. De Schryver, S. *et al.* Tryptase levels in children presenting with anaphylaxis: Temporal trends and associated factors. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 1138–1142 (2016).
298. Yoon, J. S., Kim, S., Kang, J. H., Park, J. & Yu, D. Alterations in serum protein electrophoresis profiles during the acute phase response in dogs with acute pancreatitis. *Can. J. Vet. Res. Rev. Can. Rech. Veterinaire* 84, 74–78 (2020).
299. Prabhu, M., Gangula, R. S. & Stanley, W. Diagnostic Utility of Serum Ascites Lipid and Protein Gradients in Differentiation of Ascites. *Int. J. Hepatol.* 2019, 8546010 (2019).
300. Hübner, M. *et al.* Postoperative Albumin Drop Is a Marker for Surgical Stress and a Predictor for Clinical Outcome: A Pilot Study. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2016, 8743187 (2016).

BIBLIOGRAFÍA

301. Labгаа, I., Joliat, G. R., Demartines, N. & Hübner, M. Serum albumin is an early predictor of complications after liver surgery. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 48, 559–561 (2016).
302. Ahmed, M. H., Ghatge, M. S. & Safo, M. K. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. *Subcell. Biochem.* 94, 345–382 (2020).
303. Effenberger-Neidnicht, K. & Hartmann, M. Mechanisms of Hemolysis During Sepsis. *Inflammation* 41, 1569–1581 (2018).
304. Yoo, H., Ku, S. K., Kim, S. W. & Bae, J. S. Early diagnosis of sepsis using serum hemoglobin subunit Beta. *Inflammation* 38, 394–399 (2015).
305. Gislefoss, R. E., Berge, U., Lauritzen, M., Langseth, H. & Wojewodzic, M. W. A Simple and Cost-Effective Method for Measuring Hemolysis in Biobank Serum Specimens. *Biopreservation Biobanking* 19, 525–530 (2021).
306. Brash, J. T., Ruhrberg, C. & Fantin, A. Evaluating Vascular Hyperpermeability-inducing Agents in the Skin with the Miles Assay. *J. Vis. Exp. JoVE* (2018).
307. Mendez-Barbero, N. *et al.* The TNF-like weak inducer of the apoptosis/fibroblast growth factor-inducible molecule 14 axis mediates histamine and platelet-activating factor-induced subcutaneous vascular leakage and anaphylactic shock. *J. Allergy Clin. Immunol.* 145, 583-596.e6 (2020).
308. Caironi, P. *et al.* Albumin replacement in patients with severe sepsis or septic shock. *N. Engl. J. Med.* 370, 1412–1421 (2014).
309. Rozga, J., Piątek, T. & Małkowski, P. Human albumin: old, new, and emerging applications. *Ann. Transplant.* 18, 205–217 (2013).
310. Cauwels, A., Janssen, B., Buys, E., Sips, P. & Brouckaert, P. Anaphylactic shock depends on PI3K and eNOS-derived NO. *J. Clin. Invest.* 116, 2244–2251 (2006).
311. Ogulur, I. *et al.* Advances and highlights in biomarkers of allergic diseases. *Allergy* 76, 3659–3686 (2021).
312. Hoshino, A. *et al.* Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers. *Cell* 182, 1044-1061.e18 (2020).
313. Zhong, Y., Xu, F., Wu, J., Schubert, J. & Li, M. M. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. *Ann. Lab. Med.* 41, 25–43 (2021).
314. Zhang, X., Xie, L. & Fang, X. Cell division cycle 42 reflects disease risk, symptoms, Th1/Th2 disproportion, and its short-term variation indicates symptom amelioration after treatment in allergic rhinitis patients. *J. Clin. Lab. Anal.* e24684 (2022).
315. Cedzynski, M. *et al.* L-ficolin (ficolin-2) insufficiency is associated with combined allergic and infectious respiratory disease in children. *Mol. Immunol.* 47, 415–419 (2009).
316. Yang, Y. F. *et al.* Ficolin-A/2, acting as a new regulator of macrophage polarization, mediates the inflammatory response in experimental mouse colitis. *Immunology* 151, 433–450 (2017).
317. Milosevic, J. *et al.* Profibrotic role of miR-154 in pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 47, 879–887 (2012).
318. Francuzik, W. *et al.* Serological profiling reveals hsa-miR-451a as a possible biomarker of anaphylaxis. *JCI Insight* 7, e156669 (2022).
319. Takada, Y. *et al.* Pre-Analytical Modification of Serum miRNAs: Diagnostic Reliability of Serum miRNAs in Hemolytic Diseases. *J. Clin. Med.* 10, 5045 (2021).
320. LaBelle, J. *et al.* Commercially Available Blocking Oligonucleotides Effectively Suppress Unwanted Hemolysis-Related miRNAs in a Large Whole-Blood RNA Cohort. *J. Mol. Diagn. JMD* 23, 671–682 (2021).
321. Baeza, M. L. & Zubeldia, J. M. Immunology of anaphylaxis: lessons from murine models. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 7, 49–55 (2007).
322. Turner, P. J. *et al.* Time to revisit the definition and clinical criteria for anaphylaxis? *World Allergy Organ. J.* 12, 100066 (2019).
323. Dhillon, B. K., Smith, M., Baghela, A., Lee, A. H. Y. & Hancock, R. E. W. Systems Biology Approaches to Understanding the Human Immune System. *Front. Immunol.* 11, 1683 (2020).
324. Costa Verdera, H., Gitz-Francois, J. J., Schiffelers, R. M. & Vader, P. Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 266, 100–108 (2017).

BIBLIOGRAFÍA

325. Mulcahy, L. A., Pink, R. C. & Carter, D. R. F. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles* 3, (2014).
326. Vukman, K. V., Försönits, A., Oszvald, Á., Tóth, E. Á. & Buzás, E. I. Mast cell secretome: Soluble and vesicular components. *Semin. Cell Dev. Biol.* 67, 65–73 (2017).
327. Simard, J. C., Girard, D. & Tessier, P. A. Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. *J. Leukoc. Biol.* 87, 905–914 (2010).
328. Tackenberg, H., Möller, S., Filippi, M. D. & Laskay, T. The Small GTPase Cdc42 Is a Major Regulator of Neutrophil Effector Functions. *Front. Immunol.* 11, 1197 (2020).
329. Hong-Geller, E., Holowka, D., Siraganian, R. P., Baird, B. & Cerione, R. A. Activated Cdc42/Rac reconstitutes Fcepsilon RI-mediated Ca²⁺ mobilization and degranulation in mutant RBL mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1154–1159 (2001).
330. Harjunpää, H., Lloret Asens, M., Guenther, C. & Fagerholm, S. C. Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* 10, 1078 (2019).
331. Vestweber, D. Novel insights into leukocyte extravasation. *Curr. Opin. Hematol.* 19, 212–217 (2012).
332. Goodman, M. L., Way, B. A. & Irwin, J. W. The inflammatory response to anaphylaxis and intravenous antibody or antigen. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol.* 383, 271–282 (1979).
333. Kumar, S. D., Krishnamurthy, K., Manikandan, J., Pakeerappa, P. N. & Pushparaj, P. N. Deciphering the key molecular and cellular events in neutrophil transmigration during acute inflammation. *Bioinformation* 6, 111–114 (2011).
334. Ehrchen, J. M., Sunderkötter, C., Foell, D., Vogl, T. & Roth, J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J. Leukoc. Biol.* 86, 557–566 (2009).
335. Schnekenburger, J. *et al.* The calcium binding protein S100A9 is essential for pancreatic leukocyte infiltration and induces disruption of cell-cell contacts. *J. Cell. Physiol.* 216, 558–567 (2008).
336. Kroon, J. *et al.* Inflammation-Sensitive Myosin-X Functionally Supports Leukocyte Extravasation by Cdc42-Mediated ICAM-1-Rich Endothelial Filopodia Formation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 200, 1790–1801 (2018).
337. Bui, T. M., Wiesolek, H. L. & Sumagin, R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J. Leukoc. Biol.* 108, 787–799 (2020).
338. Liu, E. G., Yin, X., Swaminathan, A. & Eisenbarth, S. C. Antigen-Presenting Cells in Food Tolerance and Allergy. *Front. Immunol.* 11, 616020 (2020).
339. Wang, H. *et al.* SKAP-55 regulates integrin adhesion and formation of T cell-APC conjugates. *Nat. Immunol.* 4, 366–374 (2003).
340. Bierer, B. E. & Hahn, W. C. T cell adhesion, avidity regulation and signaling: a molecular analysis of CD2. *Semin. Immunol.* 5, 249–261 (1993).
341. Liu, Z. *et al.* Distinct roles of ICOS and CD40L in human T-B cell adhesion and antibody production. *Cell. Immunol.* 368, 104420 (2021).
342. Vercelli, D., Jabara, H. H., Arai, K. & Geha, R. S. Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC class II antigens. *J. Exp. Med.* 169, 1295–1307 (1989).
343. Life, P., Aubry, J. P., Estoppey, S., Schnuriger, V. & Bonnefoy, J. Y. CD28 functions as an adhesion molecule and is involved in the regulation of human IgE synthesis. *Eur. J. Immunol.* 25, 333–339 (1995).
344. Luo, F. *et al.* Ficolin-2 defends against virulent Mycobacteria tuberculosis infection in vivo, and its insufficiency is associated with infection in humans. *PLoS One* 8, e73859 (2013).
345. Ramakrishnan, R. K., Al Heialy, S. & Hamid, Q. Role of IL-17 in asthma pathogenesis and its implications for the clinic. *Expert Rev. Respir. Med.* 13, 1057–1068 (2019).
346. Freedberg, I. M., Tomic-Canic, M., Komine, M. & Blumenberg, M. Keratins and the keratinocyte activation cycle. *J. Invest. Dermatol.* 116, 633–640 (2001).
347. Leyva-Castillo, J. M. *et al.* Mechanical Skin Injury Promotes Food Anaphylaxis by Driving Intestinal Mast Cell Expansion. *Immunity* 50, 1262–1275.e4 (2019).
348. Sevilla, L. M. *et al.* Glucocorticoid receptor and Klf4 co-regulate anti-inflammatory genes in keratinocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 412, 281–289 (2015).
349. Serres, M., Viac, J. & Schmitt, D. Glucocorticoid receptor localization in human epidermal cells. *Arch. Dermatol. Res.* 288, 140–146 (1996).

BIBLIOGRAFÍA

350. Oppong, E., Flink, N. & Cato, A. C. B. Molecular mechanisms of glucocorticoid action in mast cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 380, 119–126 (2013).
351. Liyanage, C. K., Galappatthy, P. & Seneviratne, S. L. Corticosteroids in management of anaphylaxis; a systematic review of evidence. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* 49, 196–207 (2017).
352. Sade, K. *et al.* Expression of inducible nitric oxide synthase in a mouse model of anaphylaxis. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 17, 379–385 (2007).
353. Cerutti, C. & Ridley, A. J. Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Exp. Cell Res.* 358, 31–38 (2017).
354. Eue, I., König, S., Pior, J. & Sorg, C. S100A8, S100A9 and the S100A8/A9 heterodimer complex specifically bind to human endothelial cells: identification and characterization of ligands for the myeloid-related proteins S100A9 and S100A8/A9 on human dermal microvascular endothelial cell line-1 cells. *Int. Immunol.* 14, 287–297 (2002).
355. Lv, J. *et al.* Endothelial Cdc42 deficiency impairs endothelial regeneration and vascular repair after inflammatory vascular injury. *Respir. Res.* 19, 27 (2018).
356. Lazki-Hagenbach, P., Klein, O. & Sagi-Eisenberg, R. The actin cytoskeleton and mast cell function. *Curr. Opin. Immunol.* 72, 27–33 (2021).
357. Ekström, E. J. *et al.* WNT5A induces release of exosomes containing pro-angiogenic and immunosuppressive factors from malignant melanoma cells. *Mol. Cancer* 13, 88 (2014).
358. Djouder, N. *et al.* Rac and phosphatidylinositol 3-kinase regulate the protein kinase B in Fc epsilon RI signaling in RBL 2H3 mast cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 1627–1634 (2001).
359. Chen, Y. C. *et al.* Differential Ca²⁺ mobilization and mast cell degranulation by FcεRI- and GPCR-mediated signaling. *Cell Calcium* 67, 31–39 (2017).
360. Kim, M. S., Rådinger, M. & Gilfillan, A. M. The multiple roles of phosphoinositide 3-kinase in mast cell biology. *Trends Immunol.* 29, 493–501 (2008).
361. Forsberg, M., Druid, P., Zheng, L., Stendahl, O. & Särndahl, E. Activation of Rac2 and Cdc42 on Fc and complement receptor ligation in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 74, 611–619 (2003).
362. Futosi, K., Fodor, S. & Mócsai, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int. Immunopharmacol.* 17, 638–650 (2013).
363. Kim, J. W. *et al.* Suppression of mast cell degranulation by a novel ceramide kinase inhibitor, the F-12509A olefin isomer K1. *Biochim. Biophys. Acta* 1738, 82–90 (2005).
364. Díaz-Perales, A. *et al.* The Role of Sphingolipids in Allergic Disorders. *Front. Allergy* 2, 675557 (2021).
365. Weston, M. C. & Peachell, P. T. Regulation of human mast cell and basophil function by cAMP. *Gen. Pharmacol.* 31, 715–719 (1998).
366. Serra-Pages, M. *et al.* E-prostanoid 2 receptors dampen mast cell degranulation via cAMP/PKA-mediated suppression of IgE-dependent signaling. *J. Leukoc. Biol.* 92, 1155–1165 (2012).
367. Gri, G. *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity* 29, 771–781 (2008).
368. Price, L. S., Norman, J. C., Ridley, A. J. & Koffer, A. The small GTPases Rac and Rho as regulators of secretion in mast cells. *Curr. Biol. CB* 5, 68–73 (1995).
369. de Lourdes Ochoa-González, F. *et al.* Calpain Participates in Cortical Cytoskeleton Modification and DNA Release during Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 182, 877–887 (2021).
370. El Ansari, Y. S., Kanagaratham, C. & Oettgen, H. C. Mast Cells as Regulators of Adaptive Immune Responses in Food Allergy. *Yale J. Biol. Med.* 93, 711–718 (2020).
371. Ogasawara, H. & Noguchi, M. Therapeutic Potential of MRGPRX2 Inhibitors on Mast Cells. *Cells* 10, 2906 (2021).
372. Redegeld, F. A., Yu, Y., Kumari, S., Charles, N. & Blank, U. Non-IgE mediated mast cell activation. *Immunol. Rev.* 282, 87–113 (2018).
373. Kardas, G. *et al.* Role of Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) in Asthma as an Immunoregulatory Factor Mediating Airway Remodeling and Possible Pharmacological Target. *Front. Pharmacol.* 11, 47 (2020).
374. Forsythe, P. The nervous system as a critical regulator of immune responses underlying allergy. *Curr. Pharm. Des.* 18, 2290–2304 (2012).
375. Birdsall, T. C. 5-Hydroxytryptophan: a clinically-effective serotonin precursor. *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.* 3, 271–280 (1998).

BIBLIOGRAFÍA

376. Gostner, J. M., Becker, K., Kofler, H., Strasser, B. & Fuchs, D. Tryptophan Metabolism in Allergic Disorders. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 169, 203–215 (2016).
377. Smita, K., Sushil Kumar, V. & Premendran, J. S. Anandamide: an update. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 21, 1–8 (2007).
378. Cruz, S. L. *et al.* Anandamide inhibits FcεRI-dependent degranulation and cytokine synthesis in mast cells through CB2 and GPR55 receptor activation. Possible involvement of CB2-GPR55 heteromers. *Int. Immunopharmacol.* 64, 298–307 (2018).
379. Rachid, O., Rawas-Qalaji, M. & Simons, K. J. Epinephrine in Anaphylaxis: Preclinical Study of Pharmacokinetics after Sublingual Administration of Taste-Masked Tablets for Potential Pediatric Use. *Pharmaceutics* 10, E24 (2018).
380. Meldrum, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130, 1007S–15S (2000).
381. Zhang, S. *et al.* Nonpeptidergic neurons suppress mast cells via glutamate to maintain skin homeostasis. *Cell* 184, 2151–2166.e16 (2021).
382. Del Arroyo, A. G. *et al.* NMDA receptor modulation of glutamate release in activated neutrophils. *EBioMedicine* 47, 457–469 (2019).
383. Klein, M. O. *et al.* Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cell. Mol. Neurobiol.* 39, 31–59 (2019).
384. Fitzgerald, P. & Dinan, T. G. Prolactin and dopamine: what is the connection? A review article. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* 22, 12–19 (2008).
385. Borba, V. V., Zandman-Goddard, G. & Shoenfeld, Y. Prolactin and Autoimmunity. *Front. Immunol.* 9, 73 (2018).
386. Filipp, G. & Mess, B. Role of the thyroid hormone system in suppression of anaphylaxis due to electrolytic lesion of the tuberal region of the hypothalamus. *Ann. Allergy* 27, 500–505 (1969).
387. Dreskin, S. C. & Andrews, K. Y. The thyroid and urticaria. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 5, 408–412 (2005).
388. Kendall, J. C., Li, X. H., Galli, S. J. & Gordon, J. R. Promotion of mouse fibroblast proliferation by IgE-dependent activation of mouse mast cells: role for mast cell tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta 1. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99, 113–123 (1997).
389. Stone, S. F. *et al.* Elevated serum cytokines during human anaphylaxis: Identification of potential mediators of acute allergic reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 786–792.e4 (2009).
390. Gordon, J. R. & Galli, S. J. Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-alpha during IgE-dependent biological responses. *J. Exp. Med.* 174, 103–107 (1991).
391. Idriss, H. T. & Naismith, J. H. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc. Res. Tech.* 50, 184–195 (2000).
392. So, T. & Ishii, N. The TNF-TNFR Family of Co-signal Molecules. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1189, 53–84 (2019).
393. Nakae, S. *et al.* Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted TNF. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 2238–2248 (2006).
394. Brown, S. G. A. *et al.* Anaphylaxis: clinical patterns, mediator release, and severity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132, 1141–1149.e5 (2013).
395. Borst, J., Hendriks, J. & Xiao, Y. CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 275–281 (2005).
396. Cancro, M. P. & Tomayko, M. M. Memory B cells and plasma cells: The differentiative continuum of humoral immunity. *Immunol. Rev.* 303, 72–82 (2021).
397. Mackay, F., Schneider, P., Rennert, P. & Browning, J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 231–264 (2003).
398. Polcz, M. E. & Barbul, A. The Role of Vitamin A in Wound Healing. *Nutr. Clin. Pract. Off. Publ. Am. Soc. Parenter. Enter. Nutr.* 34, 695–700 (2019).
399. Wiedermann, U. *et al.* Vitamin A deficiency increases inflammatory responses. *Scand. J. Immunol.* 44, 578–584 (1996).

BIBLIOGRAFÍA

400. Yang, H. *et al.* Vitamin A deficiency exacerbates extrinsic atopic dermatitis development by potentiating type 2 helper T cell-type inflammation and mast cell activation. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 50, 942–953 (2020).
401. Antushevich, H. & Wójcik, M. Review: Apelin in disease. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 483, 241–248 (2018).
402. Zha, W., Su, M., Huang, M., Cai, J. & Du, Q. Administration of Pigment Epithelium-Derived Factor Inhibits Airway Inflammation and Remodeling in Chronic OVA-Induced Mice via VEGF Suppression. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 8, 161–169 (2016).
403. Yazdi, A. S. & Ghoreschi, K. The Interleukin-1 Family. *Adv. Exp. Med. Biol.* 941, 21–29 (2016).
404. Hültner, L. *et al.* In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 5556–5563 (2000).
405. Abbas, A. K., Trotta, E., R Simeonov, D., Marson, A. & Bluestone, J. A. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Sci. Immunol.* 3, eaat1482 (2018).
406. Link, C. W. M. *et al.* IL-2-Agonist-Induced IFN- γ Exacerbates Systemic Anaphylaxis in Food Allergen-Sensitized Mice. *Front. Immunol.* 11, 596772 (2020).
407. Koch, S., Sopel, N. & Finotto, S. Th9 and other IL-9-producing cells in allergic asthma. *Semin. Immunopathol.* 39, 55–68 (2017).
408. Knoops, L., Louahed, J., Van Snick, J. & Renaud, J. C. IL-9 promotes but is not necessary for systemic anaphylaxis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 335–341 (2005).
409. Shik, D. *et al.* IL-9-producing cells in the development of IgE-mediated food allergy. *Semin. Immunopathol.* 39, 69–77 (2017).
410. Fridman, J. S. *et al.* Preclinical evaluation of local JAK1 and JAK2 inhibition in cutaneous inflammation. *J. Invest. Dermatol.* 131, 1838–1844 (2011).
411. Cotter, D. G., Schairer, D. & Eichenfield, L. Emerging therapies for atopic dermatitis: JAK inhibitors. *J. Am. Acad. Dermatol.* 78, S53–S62 (2018).
412. Yu, H., Lee, H., Herrmann, A., Buettner, R. & Jove, R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat. Rev. Cancer* 14, 736–746 (2014).
413. Ashino, S. *et al.* Janus kinase 1/3 signaling pathways are key initiators of TH2 differentiation and lung allergic responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 1162–1174 (2014).
414. Malaviya, R., Laskin, D. L. & Malaviya, R. Janus kinase-3 dependent inflammatory responses in allergic asthma. *Int. Immunopharmacol.* 10, 829–836 (2010).
415. Malaviya, R., Zhu, D., Dibirdik, I. & Uckun, F. M. Targeting Janus kinase 3 in mast cells prevents immediate hypersensitivity reactions and anaphylaxis. *J. Biol. Chem.* 274, 27028–27038 (1999).
416. Hillmer, E. J., Zhang, H., Li, H. S. & Watowich, S. S. STAT3 signaling in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 31, 1–15 (2016).
417. Siegel, A. M. *et al.* Diminished allergic disease in patients with STAT3 mutations reveals a role for STAT3 signaling in mast cell degranulation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132, 1388–1396 (2013).
418. Nikolskii, A. A. *et al.* Role of STAT3 Transcription Factor in Pathogenesis of Bronchial Asthma. *Biochem. Biokhimiia* 86, 1489–1501 (2021).
419. Sandilands, E. A. *et al.* Histamine-induced vasodilatation in the human forearm vasculature. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 76, 699–707 (2013).
420. Nakamura, T. & Murata, T. Regulation of vascular permeability in anaphylaxis. *Br. J. Pharmacol.* 175, 2538–2542 (2018).
421. Felix, S. B., Baumann, G., Helmus, S. & Sattelberger, U. The role of histamine in cardiac anaphylaxis; characterization of histaminergic H1- and H2-receptor effects. *Basic Res. Cardiol.* 83, 531–539 (1988).
422. Karki, P. & Birukova, A. A. Microtubules-associated Rac regulation of endothelial barrier: a role of Asef in acute lung injury. *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.* 65, 1089–1092 (2017).
423. Bates, D. O. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovasc. Res.* 87, 262–271 (2010).
424. Marcos-Ramiro, B., García-Weber, D. & Millán, J. TNF-induced endothelial barrier disruption: beyond actin and Rho. *Thromb. Haemost.* 112, 1088–1102 (2014).
425. Wang, L. *et al.* Suppressing STAT3 activity protects the endothelial barrier from VEGF-mediated vascular permeability. *Dis. Model. Mech.* 14, dmm049029 (2021).
426. Khakpour, S., Wilhelmson, K. & Hellman, J. Vascular endothelial cell Toll-like receptor pathways in sepsis. *Innate Immun.* 21, 827–846 (2015).

BIBLIOGRAFÍA

427. Bhattacharya, R. *et al.* The neurotransmitter dopamine modulates vascular permeability in the endothelium. *J. Mol. Signal.* 3, 14 (2008).
428. Fahey, E. & Doyle, S. L. IL-1 Family Cytokine Regulation of Vascular Permeability and Angiogenesis. *Front. Immunol.* 10, 1426 (2019).
429. Downie, G. H., Ryan, U. S., Hayes, B. A. & Friedman, M. Interleukin-2 directly increases albumin permeability of bovine and human vascular endothelium in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7, 58–65 (1992).
430. Altura, B. M., Gebrewold, A., Zheng, T. & Altura, B. T. Sphingomyelinase and ceramide analogs induce vasoconstriction and leukocyte-endothelial interactions in cerebral venules in the intact rat brain: Insight into mechanisms and possible relation to brain injury and stroke. *Brain Res. Bull.* 58, 271–278 (2002).
431. Gündüz, D. *et al.* Role of PI3K/Akt and MEK/ERK Signalling in cAMP/Epac-Mediated Endothelial Barrier Stabilisation. *Front. Physiol.* 10, 1387 (2019).
432. Laksitorini, M. D. *et al.* Impact of Wnt/ β -catenin signaling on ethanol-induced changes in brain endothelial cell permeability. *J. Neurochem.* 157, 1118–1137 (2021).
433. Zhang, H. *et al.* PEDF improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction via inhibiting vascular permeability and cardiomyocyte apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 5618–5634 (2015).
434. Cai, J. *et al.* PEDF regulates vascular permeability by a γ -secretase-mediated pathway. *PLoS One* 6, e21164 (2011).
435. Pascuali, N. *et al.* Platelet-derived growth factor B restores vascular barrier integrity and diminishes permeability in ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol. Hum. Reprod.* 26, 585–600 (2020).
436. Raines, S. M. *et al.* Loss of PDGF-B activity increases hepatic vascular permeability and enhances insulin sensitivity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301, E517–526 (2011).
437. Hind, W. H. *et al.* Endocannabinoids modulate human blood-brain barrier permeability in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 172, 3015–3027 (2015).
438. Xu, L., Cao, F., Xu, F., He, B. & Dong, Z. Bexarotene reduces blood-brain barrier permeability in cerebral ischemia-reperfusion injured rats. *PLoS One* 10, e0122744 (2015).
439. Hall, C. N. *et al.* Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* 508, 55–60 (2014).
440. Kondapaneni, M., McGregor, J. R., Salvemini, D., Laubach, V. E. & Samlowski, W. E. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is not required for IL-2-induced hypotension and vascular leak syndrome in mice. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 31, 325–333 (2008).
441. Murphy, M. B. Dopamine: a role in the pathogenesis and treatment of hypertension. *J. Hum. Hypertens.* 14 Suppl 1, S47–50 (2000).
442. Bucolo, C., Leggio, G. M., Drago, F. & Salomone, S. Dopamine outside the brain: The eye, cardiovascular system and endocrine pancreas. *Pharmacol. Ther.* 203, 107392 (2019).
443. Wettschureck, N., Strilic, B. & Offermanns, S. Passing the Vascular Barrier: Endothelial Signaling Processes Controlling Extravasation. *Physiol. Rev.* 99, 1467–1525 (2019).
444. Gao, M. *et al.* Sepsis plasma-derived exosomal miR-1-3p induces endothelial cell dysfunction by targeting SERP1. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 135, 347–365 (2021).
445. Rappa, G. *et al.* Nuclear transport of cancer extracellular vesicle-derived biomaterials through nuclear envelope invagination-associated late endosomes. *Oncotarget* 8, 14443–14461 (2017).
446. Mao, S. *et al.* Exosomal miR-375-3p breaks vascular barrier and promotes small cell lung cancer metastasis by targeting claudin-1. *Transl. Lung Cancer Res.* 10, 3155–3172 (2021).
447. Strewler, G. J. Release of cAMP from a renal epithelial cell line. *Am. J. Physiol.* 246, C224–230 (1984).
448. O'Connor, K. L., Shaw, L. M. & Mercurio, A. M. Release of cAMP gating by the α 6 β 4 integrin stimulates lamellae formation and the chemotactic migration of invasive carcinoma cells. *J. Cell Biol.* 143, 1749–1760 (1998).
449. Hofer, A. M. & Lefkimiatis, K. Extracellular calcium and cAMP: second messengers as ‘third messengers’? *Physiol. Bethesda Md* 22, 320–327 (2007).
450. Bhadra, A. *et al.* Extracellular cAMP: The Past and Visiting the Future in cAMP-Enriched Extracellular Vesicles. *Adv. Biol.* 5, e2101064 (2021).
451. Romay, M. C. *et al.* Regulation of NF- κ B signaling by oxidized glycerophospholipid and IL-1 β induced miRs-21-3p and -27a-5p in human aortic endothelial cells. *J. Lipid Res.* 56, 38–50 (2015).

BIBLIOGRAFÍA

452. Mackay, G. A., Fernandopulle, N. A., Ding, J., McComish, J. & Soeding, P. F. Antibody or Anybody? Considering the Role of MRGPRX2 in Acute Drug-Induced Anaphylaxis and as a Therapeutic Target. *Front. Immunol.* 12, 688930 (2021).
453. Biló, B. M. *et al.* Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy* 60, 1339–1349 (2005).
454. Bilò, M. B. *et al.* Hymenoptera Venom Allergy: Management of Children and Adults in Clinical Practice. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 29, 180–205 (2019).
455. Chen, Y., Yin, Y. & Jiang, H. miR-30e-5p Alleviates Inflammation and Cardiac Dysfunction After Myocardial Infarction Through Targeting PTEN. *Inflammation* 44, 769–779 (2021).



11. ANEXOS

Los **anexos** incluidos en esta tesis se pueden descargar a partir de este enlace:

https://drive.google.com/file/d/1cap9tC0T_Q-ZRjoqKYz_idpjAVhgdOS/view

O escaneando el siguiente código QR:





12. PUBLICACIONES

12.1. Publicaciones derivadas de esta tesis

1. **Núñez-Borque E**, Betancor D, Pastor-Vargas C, Fernández-Bravo S, Martín-Blázquez A, Casado-Navarro N, López-Domínguez D, Gómez-López A, Rodríguez Del Rio P, Tramón P, Beitia JM, Moreno-Aguilar C, González-de-Olano D, Goikoetxea MJ, Ibáñez-Sandín MD, Laguna JJ, Cuesta-Herranz J, Esteban V. Personalized diagnostic approach and indirect quantification of extravasation in human anaphylaxis. *Allergy*. 2022 Jul 16. doi: 10.1111/all.15443. (Cuartil: D1; Factor de impacto: 14,710).
2. **Núñez-Borque E**, Fernández-Bravo S, Pastor-Vargas C, Álvarez-Llamas G, Gutiérrez-Blázquez MD, Alwashali E, Laguna JJ, Dionicio J, Betancor D, Villalobos V, Tomé-Amat J, Cuesta-Herranz J, Benito-Martin A, Esteban V. Proteomic profile of extracellular vesicles in anaphylaxis and their role in vascular permeability. *Allergy*. 2021 Jul;76(7):2276-2279. doi: 10.1111/all.14792. (Cuartil: D1; Factor de impacto: 14,710).
3. **Núñez-Borque E**, Fernández-Bravo S, Rodríguez Del Rio P, Alwashali EM, López-Domínguez D, Gutiérrez-Blázquez MD, Laguna JJ, Tomé-Amat J, Gallego-Delgado J, Gómez-López A, Betancor D, Cuesta-Herranz J, Ibáñez-Sandín MD, Benito-Martin A, Esteban V. Increased miR-21-3p and miR-487b-3p serum levels during anaphylactic reaction in food allergic children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2021 Aug;32(6):1296-1306. doi: 10.1111/pai.13518. (Cuartil: D1; Factor de impacto: 5,464).
4. **Núñez-Borque E**, Fernández-Bravo S, Benito-Martin A, Rodríguez Del Rio P, Di Giannatale A, Alwashali EM, Di Paolo V, Galardi A, Marta Colletti, Gutiérrez-Blázquez MD, Tomé-Amat J, Pascucci L, Cuesta-Herranz J, Ibáñez-Sandín MD, Laguna JJ, Esteban V. Novel mediator in anaphylaxis: decreased levels of miR-375-3p in serum and within extracellular vesicles of patients. Enviado a *Allergy*. (Cuartil: D1; Factor de impacto: 14,710).
5. **Núñez-Borque E**, Fernández-Bravo S, Yuste-Montalvo A, Esteban V. Pathophysiological, Cellular, and Molecular Events of the Vascular System in Anaphylaxis. *Front Immunol*. 2022 Mar 8;13:836222. doi: 10.3389/fimmu.2022.836222. (Cuartil: Q1; Factor de impacto: 8,786).
6. Fernández-Bravo S, Palacio-García L, Requena-Robledo N, Yuste-Montalvo A, **Núñez-Borque E (co-último autor)**, Esteban V. Anaphylaxis: mediators, biomarkers and microenvironments. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2022 Aug 24:0. doi: 10.18176/jiaci.0854. (Cuartil: Q1; Factor de impacto: 8,185).

12.2. Otras publicaciones realizadas durante el desarrollo de esta tesis

1. Méndez-Barbero N, Yuste-Montalvo A, **Núñez-Borque E**, Jensen BM, Gutiérrez-Muñoz C, Tomé-Amat J, Garrido-Arandia M, Díaz-Perales A, Ballesteros-Martínez C, Laguna JJ, Beitia JM, Poulsen LK, Cuesta-Herranz J, Blanco-Colio LM, Esteban V. The TNF-like weak inducer of the apoptosis/fibroblast growth factor-inducible molecule 14 axis mediates histamine and platelet-activating factor-induced subcutaneous vascular leakage and anaphylactic shock. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Feb;145(2):583-596.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2019.09.019. Enviado a *Allergy*. (Cuartil: D1; Factor de impacto: 14,290).
2. **Núñez-Borque E**, González-Naranjo P, Bartolomé F, Alquézar C, Reinares-Sebastián A, Pérez C, Ceballos ML, Páez JA, Campillo NE, Martín-Requero Á. Targeting Cannabinoid Receptor Activation and BACE-1 Activity Counteracts TgAPP Mice Memory Impairment and Alzheimer's Disease Lymphoblast Alterations. *Mol Neurobiol*. 2020 Apr;57(4):1938-1951. doi: 10.1007/s12035-019-01813-4. Enviado a *Allergy*. (Cuartil: Q1; Factor de impacto: 5,687).
3. **Núñez-Borque E**, Betancor D, Fernández-Bravo S, Gómez-Cardenosa A, Esteban V, Garrido-Arandia M, de Las Heras M, Pastor-Vargas C, Cuesta-Herranz J. Allergen Profile of London Plane Tree Pollen: Clinical and Molecular Pattern in Central Spain. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2021 May 5:0. doi: 10.18176/jiaci.0702. (Cuartil: Q1; Factor de impacto: 8,185).
4. Hernández-Ramírez G, Pazos-Castro D, Gómez Torrijos E, Yuste Montalvo A, Romero-Sahagun A, González-Klein Z, Jimeno-Nogales L, Escribese MM, Extremera Ortega A, **Núñez-Borque E**, Bustamante Orvay L, Esteban V, Feo Brito F, Barber D, Tomé-Amat J, Garrido-Arandia M, Díaz-Perales A. Group 1 allergens, transported by mold spores, induce asthma exacerbation in a mouse model. *Allergy*. 2020 Sep;75(9):2388-2391. doi: 10.1111/all.14347. (Cuartil: D1; Factor de impacto: 14,710).
5. Betancor D, Gómez-López A, Villalobos-Vilda C, **Núñez-Borque E**, Fernández-Bravo S, De Las Heras Gozalo M, Pastor-Vargas C, Esteban V, Cuesta-Herranz J. LTP Allergy Follow-Up Study: Development of Allergy to New Plant Foods 10 Years Later. *Nutrients*. 2021 Jun 24;13(7):2165. doi: 10.3390/nu13072165. (Cuartil: Q1; Factor de impacto: 6,706).
6. Betancor D, **Núñez-Borque E (co-primer autor)**, Cuesta-Herranz J, Escudero C, Freundt N, Pastor-Vargas C, Ibáñez-Sandín MD. Porin: A New Button Mushroom (*Agaricus bisporus*) Allergen. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2020 Apr;30(2):135-136. doi: 10.18176/jiaci.0454. (Cuartil: Q1; Factor de impacto: 8,185).
7. Betancor D, **Núñez-Borque E**, Esteban V, Bueno-Díaz C, de Las Heras Gozalo M, Pastor-Vargas C, Cuesta-Herranz J. Reverse Takotsubo Cardiomyopathy (rTTC) After a Severe Episode of Almond-Dependent, Exercise- Induced Anaphylaxis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2021 Jun 22;31(3):253-254. doi: 10.18176/jiaci.0598. (Cuartil: Q1; Factor de impacto: 8,185).