

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Biomedicina

**DESARROLLO DE HIDROLIZADOS
PROTEICOS HIPOALERGÉNICOS E
INMUNOMODULANTES PARA EL
TRATAMIENTO DE LA ALERGIA AL
CACAHUETE**

Autora: Lucía Méndez Santana

Madrid, 29 de junio de 2025

Lucía Méndez Santana

**DESARROLLO DE HIDROLIZADOS PROTEICOS
HIPOALERGÉNICOS E INMUNOMODULANTES
PARA EL TRATAMIENTO DE LA ALERGIA AL
CACAHUETE**

Director: **Dr. Daniel Lozano Ojalvo**

Tutor académico: **Dr. Manuel Olazábal Morán**



Universidad Europea de Madrid

Facultad de Ciencias Biomédicas y de la Salud

Grado en Biomedicina



Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación
(CIAL, CSIC-UAM)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Alergia a las proteínas de los alimentos	2
1.2. Respuestas alérgicas inducidas por las proteínas de cacahuete	2
1.3. Mecanismos inmunitarios de las alergias alimentarias	3
1.4. Estrategias terapéuticas para la resolución de las alergias alimentarias	5
1.5. Estrategias basadas en péptidos para el tratamiento de las alergias alimentarias	6
2. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS	10
3.1. Procesado y desgrasado de la harina de cacahuete	10
3.2. Aislamiento del extracto proteico de cacahuete	10
3.3. Cuantificación del contenido en proteínas de la harina y los extractos de cacahuete	11
3.4. Eliminación de endotoxinas contaminantes del extracto proteico de cacahuete	11
3.5. Producción de hidrolizados enzimáticos a partir de los extractos proteicos	12
3.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico SDS-PAGE	12
3.7. Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa RP-HPLC	13
3.8. Determinación de la alergenidad de los hidrolizados por ELISA de inhibición	13
3.9. Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad inmunomodulante de los hidrolizados	14
3.10. Caracterización de poblaciones celulares mediante citometría de flujo espectral	14
3.11. Análisis de resultados y estadística	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1. Optimización de proceso de obtención de un extracto proteico de cacahuete	16
4.2. Validación de la extracción y enriquecimiento de los alérgenos de cacahuete	17
4.3. Generación de hidrolizados enzimáticos de los alérgenos de la cacahuete	22
4.4. Reducción de la capacidad de unión de IgE específica en los hidrolizados de cacahuete producidos con pepsina, tripsina y quimiotripsina	25
4.5. Propiedades inmunomodulantes de los hidrolizados de cacahuete seleccionados	27
5. CONCLUSIONES	30
6. BIBLIOGRAFÍA	31
ANEXOS	I-XIII

RESUMEN

La alergia a los frutos secos, especialmente al cacahuete, constituye una de las principales causas de anafilaxia alimentaria a nivel mundial, afectando de forma significativa a la calidad de vida de los pacientes y sus familias. En la actualidad, la inmunoterapia oral con el alérgeno intacto representa la única opción terapéutica evaluada clínicamente, aunque su aplicación presenta importantes limitaciones en términos de seguridad y eficacia a largo plazo. En este contexto, la obtención de péptidos bioactivos mediante hidrólisis enzimática de los alérgenos alimentarios se plantea como una alternativa prometedora para el desarrollo de formulaciones hipoalergénicas capaces de inducir la tolerancia inmunológica de forma segura.

En el presente trabajo se desarrollaron hidrolizados enzimáticos a partir del extracto proteico de cacahuete desgrasado, previamente caracterizado mediante SDS-PAGE y HPLC. Para ello, se aplicaron digestiones enzimáticas con pepsina, tripsina y quimiotripsina bajo condiciones controladas. Los productos resultantes fueron evaluados en términos de hipoalergenicidad mediante ELISA de inhibición con suero de pacientes alérgicos. Asimismo, se caracterizó su capacidad inmunomodulante mediante citometría espectral para determinar su impacto en el fenotipo celular (T_H1 / T_H2) y en la producción de células T reguladoras.

Los resultados obtenidos muestran que la hidrólisis con pepsina, tripsina y quimiotripsina reduce significativamente la capacidad de unión a IgE específica, lo que indica un perfil claramente hipoalergénico. Además, reflejan la capacidad inmunomoduladora de los péptidos obtenidos a partir de las tres enzimas mediante la reducción de la respuesta de tipo T_H2 y la inducción de células T reguladoras.

En conjunto, los datos respaldan la viabilidad de los hidrolizados con dichas enzimas como base para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas más seguras y eficaces frente a la alergia al cacahuete.

PALABRAS CLAVE

Alergia alimentaria; Cacahuete; Hidrolizado enzimático; Hipoalergenicidad; Inmunomodulación; Péptidos; Células T_H2 ; Células T reguladoras.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Alergia a las proteínas de los alimentos

Las alergias alimentarias son reacciones de hipersensibilidad inmediata mediadas por inmunoglobulina E e inducidas en personas sensibilizadas como respuesta a la ingesta de proteínas antigénicas presentes en ciertos alimentos (1). El origen de este tipo de reacciones alérgicas reside en una falta de adquisición de tolerancia oral a los antígenos alimentarios o en la pérdida de la misma una vez ya había sido establecida (2). Esto deriva en una activación exacerbada del sistema inmune adaptativo, caracterizada por la generación y expansión de células T y B específicas de alérgenos y por la producción de IgE específica responsable de desencadenar las reacciones anafilácticas inducidas por la liberación sistémica de mediadores inflamatorios (3). En las últimas décadas, las alergias alimentarias se han convertido en un problema prioritario de salud pública a nivel global debido a su creciente prevalencia y al notable impacto económico que suponen, los cuales alcanzan los 23 mil millones de dólares anuales en los Estados Unidos (4,5). Actualmente, el 90% de reacciones alérgicas se deben al cacahuete, los frutos secos, crustáceos, pescado, el trigo, la soja, la leche, el huevo, mostaza, sésamo, apio, altramuiz y los moluscos (6). De todas ellas, la alergia al cacahuete es una de las más prevalentes en países occidentales, llegando a afectar el 1,5 % - 2,1 % de la población (7).

1.2 Respuestas alérgicas inducidas por las proteínas del cacahuete

De todos los catorce principales alérgenos alimentarios, el cacahuete es considerado como el principal desencadenante de reacciones anafilácticas graves en sujetos sensibilizados y causante de respuestas fatales incompatibles con la vida a nivel mundial (8–10). Estos hechos sumados al preocupante aumento de casos, ha llevado a la comunidad científica a centrar su atención en los alérgenos de cacahuete y sus efectos clínicos.

Un alto número de proteínas del cacahuete han sido descritas como alérgicas (Anexo I), siendo Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6 y Ara h 9 las que presentan una mayor relevancia clínica (11,12). Ara h 1 y Ara h 3 son proteínas de reserva de tipo globulina 7S y 11S respectivamente, ambas pertenecientes a la superfamilia de las cupinas. En concreto, Ara h 1 es una vicilina 7S homotrimérica, que cuenta con una estructura altamente estable gracias a sus interacciones hidrofóbicas y enlaces disulfuro. Asimismo, presenta dominios inhibidores de tripsina, evadiendo la degradación proteolítica durante la digestión (13,14).

Estas características explican la presencia de IgE específicas frente a esta proteína en aproximadamente el 90% de los pacientes alérgicos al cacahuete (15).

Por otro lado, Ara h 2 y Ara h 6 son proteínas de almacenamiento de tipo 2S albúmina, pertenecientes a la superfamilia de las prolaminas. De todas ellas, Ara h 2 es el alérgeno más relevante a nivel mundial en términos de sensibilización y diagnóstico (16,17). Su elevada capacidad alergénica se debe a su estructura compacta reforzada por enlaces disulfuro, haciéndola altamente resistente a la digestión. Ara h 6 es el segundo alérgeno más relevante a nivel clínico y comparte un 59% de homología estructural con Ara h 2, por lo que es muy frecuente la reactividad cruzada (18).

Los alérgenos descritos en el cacahuete comparten muchas de las propiedades fisicoquímicas que han sido previamente asociadas a proteínas alergénicas presentes en otros alimentos. Entre ellas destacan su resistencia a la digestión gastrointestinal, bajo peso molecular, alta hidrosolubilidad y elevada estabilidad frente a la desnaturalización térmica y enzimática (19). A nivel estructural, muchos alérgenos presentan secuencias repetitivas y una fuerte tendencia a formar agregados, lo que incrementa su inmunogenicidad al facilitar la presentación multivalente de epítomos IgE (20). Además, los alérgenos del cacahuete suelen presentar modificaciones postraduccionales que contribuyen a estabilizar la estructura tridimensional de estas proteínas, lo cual ha sido asociado con la inducción de respuestas pro-alérgicas de las células del sistema inmunológico (21). Estas propiedades comunes a la mayor parte de alérgenos del cacahuete favorecen que sufran una escasa proteólisis en el estómago y sean capaces de alcanzar la mucosa intestinal prácticamente intactos, generando la activación de células epiteliales, facilitando su reconocimiento por las células del sistema inmunológico intestinal y promoviendo el desarrollo de respuestas pro-inflamatorias resultando sensibilización alérgica a este alimento.

1.3 Mecanismos inmunitarios de las alergias alimentarias

Bajo condiciones fisiológicas, el sistema inmunitario intestinal mantiene un estado de tolerancia oral, definido como la ausencia de una respuesta inmune celular y/o humoral frente a antígenos alimentarios (22). No obstante, alteraciones en el establecimiento o mantenimiento de este equilibrio pueden conducir a la pérdida de la tolerancia y al desarrollo de respuestas alérgicas mediadas por IgE (2,23).

1.3.1 Sensibilización a las proteínas alérgicas de los alimentos

Pese a que los mecanismos que subyacen a la disrupción de este equilibrio inmunológico no se conocen con exactitud (24), la agresión del epitelio intestinal se ha considerado como uno de los principales factores asociados con la pérdida del ambiente tolerogénico frente a las proteínas alimentarias (25,26). Ciertos agentes ambientales, infecciosos o genéticos pueden inducir daños en el epitelio y promover el desarrollo de respuestas alérgicas del tipo 2, entre las que destacan la activación de células dendríticas (DCs, del inglés “*dendritic cells*”) pro-inflamatorias, y la diferenciación de células T CD4⁺ efectoras o *helper* (T_H) no diferenciadas (T_H0) a células T_H de tipo 2 (T_H2). Estas últimas, en respuesta al reconocimiento específico de epítomos mediante el receptor de células T (TCR), producen citoquinas del tipo alérgico como la IL-4, IL-5 e IL-13 (27).

Aquellos alérgenos del cacahuete resistentes a la digestión gastrointestinal pueden ser captados por DCs. Estas DC activadas migran a los nódulos linfáticos mesentéricos donde, mediante el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II), presentan el alérgeno alimentario e inducen la diferenciación de células *naïve* Th0 a células T_H2 específicas (28). Las células T_H2 activadas liberan IL-4, la cual inhibe la generación de células CD4⁺ Foxp3⁺ T reguladoras (Tregs), limitando sus funciones promotoras de la tolerancia a las proteínas alimentarias mediadas por citoquinas reguladoras, como la IL-10. Por otro lado, la IL-4 favorece la activación de las células B *naïve* en los nódulos linfáticos mesentéricos, promoviendo su diferenciación a células B de memoria y células plasmáticas productoras de IgE específica del alérgeno alimentario. Las moléculas de IgE específica liberadas se unen entonces a su receptor de alta afinidad FCεRI, presente en la superficie de los mastocitos residentes en el intestino y de los basófilos circulantes en la sangre periférica (29). Además de la liberación de IL-4, la activación de las células T_H2 induce su migración de los nódulos linfáticos mesentéricos a la lámina propia, donde secretan IL-5 e IL-13, las cuales reclutan y activan eosinófilos y basófilos (30) (Figura 1).

1.3.2 Respuestas anafilácticas inducidas por IgE específica del alérgeno alimentario

Tras la sensibilización, el alérgeno es reconocido por las moléculas de IgE alérgeno-específicas en la superficie de mastocitos y basófilos circulantes durante cualquier reexposición que pueda ocurrir frente al alimento. El entrecruzamiento de varias moléculas de IgE ocasiona la activación de múltiples vías de señalización que culminan con la liberación inmediata de mediadores de la inflamación, como la histamina,

prostaglandinas, leucotrienos y proteasas (31), responsables de la sintomatología clínica de la anafilaxia (29). Ante el inminente riesgo existente a la exposición accidental a alérgenos, existe un interés científico, clínico, institucional y social para impulsar el desarrollo de estrategias terapéuticas que sean capaces de promover la tolerancia oral a los alimentos y resolver definitivamente esta enfermedad (Figura 1).

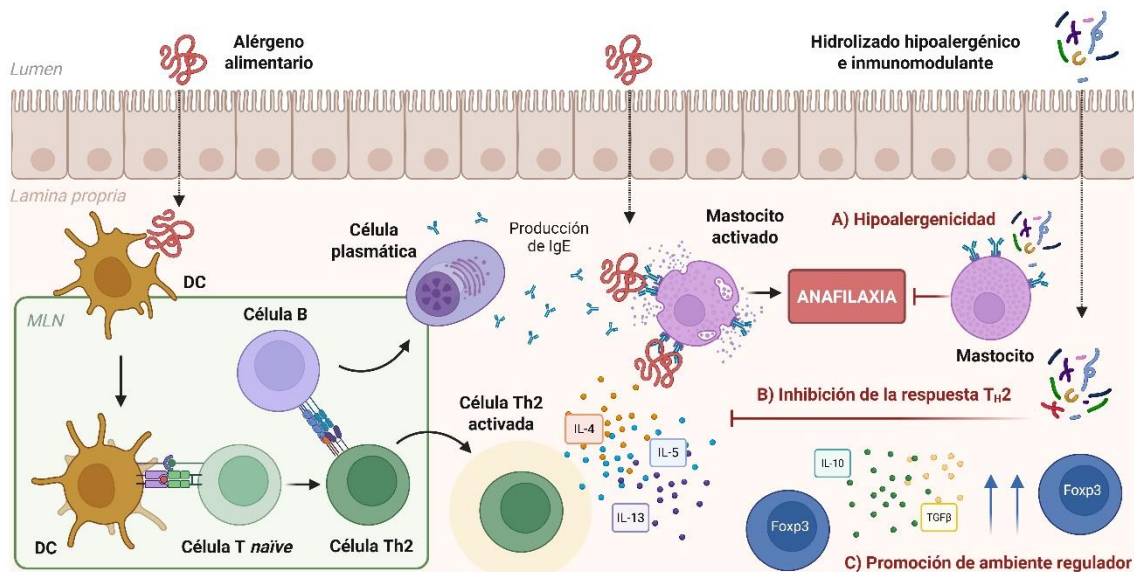


Figura 1. Mecanismo inmunario de las alergias alimentarias. Durante la sensibilización, el alérgeno es captado por las células dendríticas (DCs) de la lámina propia y migran a los nódulos linfáticos mesentéricos (MLN). Las DCs presentan el alérgeno a células T *naíve*, que se diferencian a células efectoras del tipo 2 (Th2) específicas del alérgeno, y a las células B específicas, que se diferencian a células plasmáticas secretoras de IgE específica. Esta IgE se une a los receptores FcεRIα de los mastocitos. Durante la anafilaxia, el alérgeno traspasa el epitelio y es reconocido por la IgE unida a mastocitos induciendo su activación, provocando la liberación de moléculas inflamatorias que causan los síntomas anafilácticos. Los **hidrolizados enzimáticos de los alérgenos** contienen péptidos cortos incapaces de activar los mastocitos [(A) Hipoalergenicidad], poseen propiedades inmunomodulantes que inhiben la respuesta Th2 (B) y promueven la expansión de células Tregs (C).

1.4 Estrategias terapéuticas para la resolución de las alergias alimentarias

En la actualidad, no existe ningún tratamiento seguro y eficaz que permita la desensibilización duradera de las personas alérgicas a los alimentos ni se conocen terapias que sean capaces de generar tolerancia oral permanente a los alimentos alérgicos (32), siendo la única recomendación clínica consensuada la eliminación del alimento de la dieta (29). Ante esta problemática, se han desarrollado diferentes formas de inmunoterapia alérgeno-específica como estrategias a largo plazo, cuyo objetivo es modificar la respuesta inmunológica mediante la exposición controlada al alérgeno, buscando inducir desensibilización o incluso tolerancia clínica sostenida (33). Entre las diferencias técnicas existentes, la inmunoterapia oral (OIT) ha mostrado un éxito relativo en sujetos alérgicos a alimentos (34).

La OIT consiste en la administración progresiva a dosis crecientes del alérgeno, con el objetivo de inducir la desensibilización y la tolerancia oral permanente al alimento desencadenante (35). Durante las últimas décadas, se han llevado a cabo diversos estudios que confirman su eficacia. El estudio PALADISE se basó en la administración oral de AR101, un polvo derivado de cacahuete que permitió alcanzar la tolerancia al cacahuete en el 67,2 % de pacientes frente al 4 % del grupo placebo. Sin embargo, este estudio mostró que el 98,7% de los participantes experimentaron al menos un efecto adverso (36). En este sentido, el estudio POISED publicado por Lancet en 2019 remarcó los dos problemas principales a los que se enfrenta este abordaje: la resensibilización tras la interrupción del tratamiento o al reducir la dosis del alérgeno, lo que sugiere una administración continua; y el elevado riesgo a sufrir reacciones adversas, incluyendo la anafilaxia (37).

En definitiva, las estrategias de OIT que utilizan el alérgeno intacto como agente terapéutico que se han evaluado hasta la actualidad muestran importantes limitaciones entre las que destacan: requerir tratamientos prolongados, conllevar riesgos significativos y no garantizan una protección duradera frente al alérgeno (38). Por ello, sigue siendo prioritario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas más seguras, eficaces y sostenibles a largo plazo. En respuesta, los péptidos sintéticos han cobrado un gran interés como enfoque alternativo en el abordaje de las alergias alimentarias (39).

1.5 Estrategias basadas en péptidos para el tratamiento de las alergias alimentarias

El uso de péptidos inmunomodulantes como agentes terapéuticos en las OITs se presenta como una alternativa más segura y eficaz frente las OITs convencionales. Ciertos péptidos sintéticos han sido utilizados para este propósito, como el PVX108, una mezcla de siete péptidos sintéticos que identificados como epítomos inmunodominantes de células T CD4⁺ de los alérgenos del cacahuete (40). Al tratarse de péptidos de pequeño tamaño, no son reconocidos por las IgE específicas, evitando así la activación de mastocitos y basófilos y reduciendo el riesgo de reacciones adversas (41). No obstante, esta estrategia presenta limitaciones: la producción de péptidos sintéticos es costosa y técnicamente exigente (40) y, dado el bajo número de péptidos de esta fórmula, su diversidad antigénica es escasa, limitando su efecto a unos pocos epítomos de los numerosos existentes en las múltiples proteínas alergénicas presentes en el cacahuete restringe su capacidad inmunomodulante (42).

En este sentido, los hidrolizados de proteínas alimentarias han demostrado un notable potencial para reducir la alergenicidad y modular la respuesta inmunitaria. En el caso del huevo, este enfoque ha permitido obtener formulaciones con una marcada disminución en la unión de IgE, resultando bien toleradas en modelos experimentales preclínicos (43). Por otro lado, la hidrólisis enzimática *in vitro* de proteínas alimentarias permite obtener hidrolizados que contienen una combinación de péptidos inmunomodulantes no específicos y péptidos con epítomos reconocibles por el TCR de células T_H2 específicas del alérgeno (44).

Uno de los principales efectos de los péptidos no específicos es la activación de los receptores tipo Toll (TLR) en células epiteliales intestinales, hecho que incrementa la expresión de la retinaldehído deshidrogenasa (RALDH) y, por ende, la conversión de la vitamina A en ácido retinoico. Estos receptores también son estimulados en células dendríticas $CD103^+$, favoreciendo su perfil tolerogénico al inducir la secreción de TGF β . La acción sinérgica del ácido retinoico y el TGF- β en este contexto regulador promueve la diferenciación de células T $CD4^+$ *naïve* a Tregs Foxp3 $^+$ y Tregs Foxp3 $^+$ ROR γT^+ , contribuyendo así al mantenimiento de la tolerancia inmunológica a través de la supresión de respuestas T_H2 y T_H17 (45,46).

Paralelamente, los péptidos específicos son secuencias cortas que contienen epítomos reconocidos por células T_H2 antígeno-específicas. En un entorno tolerogénico caracterizado por niveles elevados de TGF β , IL-10 y ácido retinoico, su presentación antigénica por células presentadoras de antígeno con fenotipo tolerogénico tiene lugar en ausencia de señales coestimuladoras CD80/86, impidiendo la activación completa de las células T_H2 . Este proceso conduce a un estado de anergia de las células T_H2 antígeno-específicas y a su depleción clonal, lo que favorece el establecimiento de la tolerancia oral (47,48). Además, esta respuesta no solo contribuye a la eliminación de células específicas de antígeno, sino que previene procesos de sensibilización frente a otros alérgenos de manera indirecta.

En conclusión, las estrategias basadas en péptidos para el tratamiento de las alergias alimentarias se presentan como una opción más segura y eficaz que las OIT convencionales. Al fragmentarse las proteínas nativas en péptidos de menor tamaño, se evita en gran medida su reconocimiento por las moléculas de IgE responsables de

desencadenar reacciones anafilácticas (hipoalergenicidad) (Figura 1A) y al mismo tiempo se conserva la capacidad de estos fragmentos para inducir respuestas inmunológicas tolerogénicas. Estos péptidos pueden actuar de forma individual o sinérgica para neutralizar los efectos pro-alérgicos de la proteína completa, modulando la producción de citoquinas (Figura 1B) y favoreciendo la inducción de células Tregs (Figura 1C) (inmunomodulación).

Este trabajo contribuye al cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). Concretamente al ODS 3, al promover la salud y el bienestar mediante el desarrollo de un tratamiento más eficaz, rápido y seguro para la alergia al cacahuete; al ODS 12, al fomentar una producción responsable mediante el uso de materias primas accesibles y procesos enzimáticos sostenibles; y al ODS 9, al impulsar la innovación en el ámbito biotecnológico a través de nuevas estrategias terapéuticas basadas en hidrolizados enzimáticos.



2. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

En base a todo lo anteriormente expuesto, este trabajo plantea como **hipótesis** que la hidrólisis enzimática de los alérgenos del cacahuete bajo condiciones óptimas da lugar a péptidos con propiedades hipoalergénicas e inmunomodulantes que pueden ser una alternativa segura y eficaz para el tratamiento de la alergia a este alimento. Para validar la hipótesis, el presente trabajo persigue dos **objetivos principales**:

1. Optimizar un proceso extracción de una fracción proteica del cacahuete que esté enriquecida para los principales sus alérgenos y pueda ser empleada para producir hidrolizados proteicos utilizando enzimas de grado alimentario.
2. Determinar las condiciones adecuadas para obtener hidrolizados de los alérgenos de cacahuete que contengan péptidos con una alergenidad reducida y posean propiedades inmunomodulantes que reduzcan las manifestaciones alérgicas y promuevan las respuestas reguladoras.

Para alcanzar estos objetivos, el **plan de trabajo** establecido se estructura en las tres etapas que se reflejan en la Figura 2:

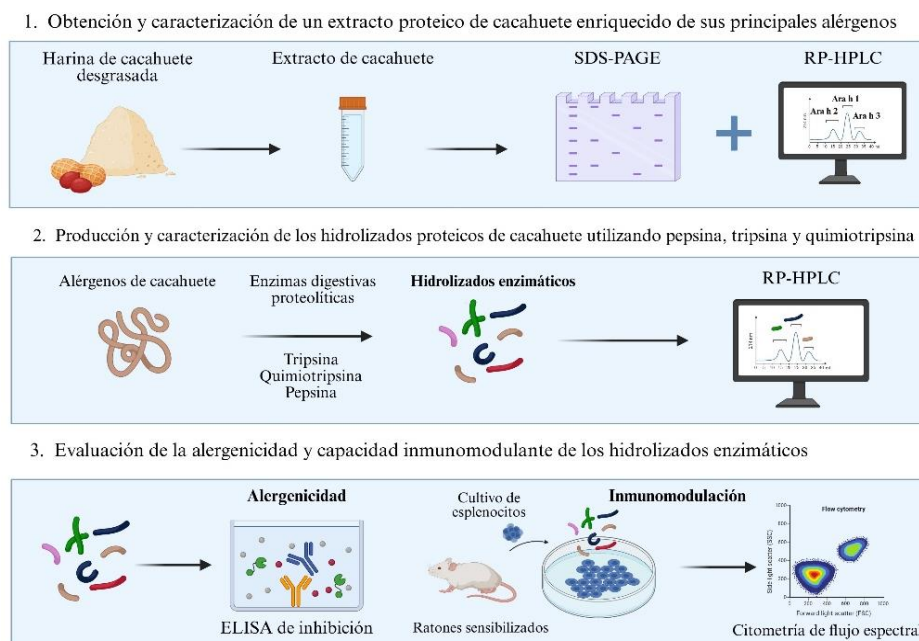


Figura 2. Esquema del plan de trabajo diseñado. 1) Obtención y caracterización de un extracto proteico de cacahuete enriquecido para sus principales alérgenos; 2) Producción y caracterización de hidrolizados proteicos de cacahuete usando tripsina, quimiotripsina y pepsina; 3) Evaluación de la alergenidad y capacidad inmunomodulante de los hidrolizados. SDS-PAGE, Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico; RP-HPLC, Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa; ELISA, Ensayo inmunoenzimático de adsorción.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Procesado y desgrasado de la harina de cacahuete

Los cacahuetes crudos fueron adquiridos en un comercio local (El Corte Inglés, Madrid, España), las pieles retiradas manualmente y, tras su congelación en nitrógeno líquido, se trituraron utilizando un molinillo de cocina (Electrodomésticos Taurus, S.L., Lleida, España). El desgrasado del triturado de cacahuete fue externalizado a la Unidad de Análisis al Exterior del Instituto de la Grasa (CSIC, Sevilla, España) y llevado a cabo mediante reflujo en equipo Soxhlet (OPSIS LiquidLINE, Furulund, Suecia) con hexano durante 6h siguiendo el protocolo previamente establecido por Rigby y col. (2008) (49).

3.2. Aislamiento del extracto proteico de cacahuete

Para la optimización del procedimiento de enriquecimiento del extracto proteico, la harina de cacahuete desgrasada se homogeneizó con un molinillo de cocina (Electrodomésticos Taurus, S.L.), se solubilizó en tampón Trizma® base 20 mM ajustada con HCl (Tris-HCl; pH 8,5; ambos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y salino (PBS; pH 7,5; Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Alemania) a las relaciones harina/tampón de 1/30, 1/50, 1/80 y 1/100 (p/v). La validación del proceso para el aislamiento de los alérgenos del cacahuete y su caracterización se llevó a cabo utilizando un ratio 1/80 (p/v) utilizando el tampón Tris-HCl para la extracción. Tras solubilizar la harina en Tris-HCl, la solución fue centrifugada a 16.000 x g durante 30 min a 4°C y el sobrenadante filtrado cuatro veces a través de lana de vidrio (Scharlab, Sentmenat, España). A continuación, las muestras se filtraron con papel de filtro (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) y una membrana con 0,45 µm de tamaño de poro (Labbox Export S.L., Barcelona, España).

Tanto en los extractos obtenidos en el laboratorio como en los generados en la planta piloto, las sales del buffer de extracción se eliminaron mediante diálisis utilizando dispositivos Amicon®Ultra (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) o membranas Spectra/Por® (Thermo Fisher Scientific) de 10 kDa, realizándose lavados con agua Milli-Q. La presencia de sales en los preparados se determinó realizando medidas de la conductividad del eluido resultante de cada lavado con un conductímetro Schott CG 855 (SI Analytics GmbH, Mainz, Alemania), considerándose adecuado cuando los valores de conductividad eran $\leq 10 \mu\text{S}/\text{cm}$. Las muestras resultantes se liofilizaron en un instrumento LyoQuest (Telstar, Terrassa, España) y se conservaron a -20°C.

3.3. Cuantificación del contenido en proteínas de la harina y los extractos de cacahuete

El contenido proteico de los extractos de cacahuete obtenidos se realizó mediante análisis elemental y/o el ensayo de ácido bicinonínico (BCA). La cuantificación mediante el método de análisis elemental fue externalizada al Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM, Madrid, España) y se basó en la determinación analítica del nitrógeno total presente en las muestras mediante combustión seguida de espectrometría de absorción atómica. Los ensayos de BCA se realizaron con el kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. La curva de cuantificación se preparó con diluciones seriadas de albúmina sérica bovina solubilizada en Tris HCl y las muestras se analizaron por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 562 nm con el lector Biotek Cytation 5 (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU.) Los rendimientos de los procesos se expresaron de dos formas: basados en materia seca (g producto/g pellet molido) y en proteínas (g proteínas en el producto/g proteínas en el pellet molido). También se determinaron los porcentajes de eliminación de compuestos fenólicos. Para todos los casos, se consideró como el 100% la cantidad inicial de pellet molido de girasol que se empleó para la obtención del producto en estudio.

3.4. Eliminación de endotoxinas contaminantes del extracto proteico de cacahuete

La contaminación natural por lipopolisacárido (LPS) bacteriano en los extractos proteicos aislados de frutos secos ha sido identificada como una importante fuente de respuestas inespecíficas (activación de monocitos y células T_H1 , entre otras) que condicionan la evaluación *in vitro* de la respuesta alérgica del tipo T_H2 en este tipo de muestras (50,51). El LPS de los extractos de cacahuete obtenidos fue eliminado usando columnas comerciales Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Columns (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se prepararon a 5 mg/mL y se purificaron a través de la columna mediante pases secuenciales, recogiendo muestras en cada pase para cuantificar el progreso de reducción del LPS durante los lavados.

Los niveles de LPS se cuantificaron mediante un ensayo *in vitro* basado en la línea celular THP1-Blue™ (InVivoGen, San Diego, EE.UU.) siguiendo el protocolo previamente publicado (52). Brevemente, las células se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina

(P/S; todo de (Capricorn Scientific) y 200 µg/mL de Zeocina™ (InvivoGen, San Diego, EE.UU.). Para la cuantificación de LPS, se sembraron 2×10^4 células por pocillo en una placa de 96 pocillos (Sigma-Aldrich) y se incubaron con 10 µL de las muestras (5 mg/mL) durante 24h a 37°C y 5% CO₂. La curva de cuantificación se preparó con diluciones seriadas de LPS de *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich), utilizando agua Mili-Q estéril como control negativo. El reportero de fosfatasa alcalina (SEAP) secretado se cuantificó utilizando el reactivo Quanti-Blue™ (InvivoGen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron incubadas por 2h y la absorbancia medida a 655 nm en un lector Biotek Cytation 5 (Agilent Technologies).

3.5. Producción de hidrolizados enzimáticos a partir de los extractos proteicos

La hidrólisis del extracto enriquecido para los principales alérgenos del cacahuete se llevó a cabo utilizaron tripsina (EC 3.4.21.4, 2000 U/mg; Sigma-Aldrich), quimiotripsina (EC 3.4.21.1, 40 U/mg; Sigma-Aldrich) y pepsina (EC 3.4.23.1, 3440 U/mg; Sigma-Aldrich). Para los hidrolizados con tripsina y quimiotripsina, el extracto se preparó a 5 mg de proteína/mL en PBS a pH 7,5 y las enzimas se usaron a una proporción 1:20 (enzima:sustrato, p/p). Para evaluar el progreso de la hidrólisis, se recogieron muestras antes de comenzar (CQ/T 0) y tras 30 min, 2h, 6h, 18h, 24h y 48h (CQ/T 30', 2h, 6h, 18h, 24h y 48h) de incubación. Para la hidrólisis con pepsina, el extracto (5 mg de proteína/mL) se disolvió en agua Mili-Q a pH 2 acidulada con HCl 10M y se añadieron 172 U de pepsina por mg de proteína. Se recogieron muestras al inicio (CP0) y tras 10 min, 30 min, 60 min, 2h, 6h, 18h y 24h (CP10', 30', 60', 2h, 6h, 18h y 24h). Para todas las enzimas, la hidrólisis se realizó a 37°C con una agitación de 150 rpm. En los hidrolizados con tripsina y quimiotripsina, las enzimas se inactivaron aumentando la temperatura a 95°C durante 15 min, mientras que en los de pepsina se inactivaron ajustando el pH a 7. Finalmente, los hidrolizados fueron centrifugados a 5000 rpm durante 10 min y los sobrenadantes conservados a -20°C.

3.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Los extractos proteicos de cacahuete se diluyeron tanto para los geles Criterion™ XT Bis-Tris al 12% como para los Criterion™ Tris-Tricine al 16,5% (ambos de Bio-Rad, Richmond, EE.UU.) a una concentración de 1 mg de proteína/mL en tampón de muestra (0,5 M Tris-HCl a pH 6,8, SDS al 2%, 10% glicerol, 0.05% azul de bromofenol y 2-β-mercaptoetanol al 4% en agua Mili-Q; todos de Sigma-Aldrich), se calentaron 10 min a

95°C y se añadieron 40 µg de muestra en por pocillo. La separación se realizó en los tampones XT-MES y Tris-Tricina para los geles Bis-Tris y Tris-Tricina, respectivamente, a un voltaje de 100 voltios en un equipo de electroforesis PowerPac Universal (Bio-Rad). Para una mejor fijación de los péptidos en los análisis en Tris-Tricina, los geles se incubaron en una solución al 30% metanol y 10% ácido acético glacial (ambos de Sigma-Aldrich) en agua Mili-Q durante 30 min. Finalmente, los geles se tiñeron con Azul Coomassie (Nzytech, Lisboa, Portugal) durante 15 min.

3.7. Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC)

Las muestras de aislados proteicos de cacahuete y de los hidrolizados producidos se analizaron mediante cromatografía de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC) empleando el instrumento HPLC Waters 600 (Waters, Milford, EE.UU.). La separación se llevó a cabo en una columna XBridge BEH300 C18 (5 µm 4.6x250 mm, BioRad 300 Å; BioRad). Las condiciones de operación fueron: flujo de 1 mL/min, volumen de inyección de 50 µL, solvente A 0,037% TFA (Sigma-Aldrich) en agua Mili-Q y solvente B 0,027% TFA en acetonitrilo (VWR Chemicals). El gradiente de fase B en A utilizado fue de 0 a 70% en 75 min, seguido de un 100% de fase B durante 30 min. Los datos fueron procesados a través del software Empower 2000 (Waters).

3.8. Determinación de la alergenicidad de los hidrolizados por ELISA de inhibición

La capacidad de unión a la IgE específica de cacahuete de los péptidos contenidos en los hidrolizados generado fue cuantificada mediante ELISA de inhibición, siguiendo un protocolo previamente publicado por nuestro grupo (53). Las placas se tapizaron con 50 µg de proteína del extracto de cacahuete por pocillo diluido en PBS con una incubación ON a 4°C y se bloquearon con PBS-Tween 20 al 2.5% (PBS-T 2.5%) durante 2 h a RT. En paralelo, diluciones seriadas del extracto y de los distintos hidrolizados se incubaron con un pool de sueros recogidos de sangre de pacientes alérgicos al cacahuete (n=3) diluido 1/150 (v/v) en PBS-T 0.05 % durante 2 h a RT. El valor de IgE específica del cacahuete en todos los sueros fue determinado por ImmunoCAP (Thermo Fisher Scientific) y resultaron > 100 UI/mL. Tras la incubación, las mezclas muestra-suero se adicionaron a la placa e incubaron 2 h a RT. A continuación, se añadió anti-IgE biotinilada (*goat anti-human IgE-biotin*, Invitrogen, Waltham, EE.UU.) diluido 1/1000 (v/v) en PBS-T 0,05% y se incubó 1h a RT., antes de agregar avidina-HRP (Thermo Fisher Scientific) diluida 1/10000 (v/v) en PBS-T 0,05%, que se mantuvo 20 min a RT. La reacción se

desarrolló con 50 μ L de TMB (Sigma-Aldrich) como sustrato y se detuvo con 50 μ L de H_2SO_4 0,5 M (Panreac Química S.L.U., Barcelona, España). La absorbancia se midió a 450 nm en un lector Biotek Cytation 5 (Agilent Technologies). Como control positivo se utilizó suero diluido 1/150 (v/v) en PBS-T 0,05 % y como control negativo el extracto diluido en PBS.

3.9. Evaluación *in vitro* de la capacidad inmunomodulante de los hidrolizados

Se utilizaron esplenocitos obtenidos tras el sacrificio de ratones BALB/c ($n=5$; Charles River, Saint-Germain-Nuelles, Francia) sensibilizados al cacahuete utilizando el modelo de alergia alimentaria previamente descrito en Musa y col. (2025) (54). En resumen, los ratones recibieron 3 dosis semanales de 100 μ g del extracto de cacahuete junto con el adyuvante Imject® Alum (Thermo Fisher Scientific) vía intraperitoneal durante 3 semanas. Tras el sacrificio, se recogieron los bazos para aislar los esplenocitos y sangre periférica, utilizada para obtener las muestras de suero. La autora de este trabajo no participó de forma directa en la manipulación de los animales y sus tareas en este protocolo se limitó al procesamiento de las muestras recogidas *post mortem*. El desarrollo de alergia a cacahuete en los ratones que siguieron este protocolo de sensibilización alérgica fue comprobado mediante la cuantificación de IgG1 específica de cacahuete en el suero utilizando un protocolo de ELISA previamente descrito por nuestro grupo (50).

Los bazos recogidos se procesaron siguiendo el protocolo previamente descrito por Lozano-Ojalvo y col. (2017) para obtener las suspensiones celulares que fueron utilizadas para los ensayos de inmunomodulación *in vitro* (55). Las células aisladas se prepararon en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS, 1% de L-glutamina y 1% de P/S (todo de Capricorn Scientific)], se sembraron 1×10^6 células/pocillo y se cultivaron durante 72 h con 200 μ g/mL del extracto de cacahuete (C), los hidrolizados seleccionados (CP24h, CQ18h y CT18h) y su combinación (C+CP24h, C+CQ18h y C+CT18h). Como control negativo las células se cultivaron en el medio sin estímulo y el control positivo consistió en Concanavalina A (2,5 μ g/mL; Sigma-Aldrich). Tras 72 h, las células se recogieron para su análisis por citometría de flujo,

3.10. Caracterización de poblaciones celulares mediante citometría de flujo espectral

Los esplenocitos incubados *in vitro* con el extracto e hidrolizados de cacahuete fueron recuperados, lavados con PBS y teñidos con la sonda de viabilidad Zombi NIR

(BioLegend, San Diego, EE.UU.) durante 10 min a RT. Se lavaron con tampón FACS [2% BSA (Capricorn Scientific) y 1mM EDTA (Sigma-Aldrich) en PBS], se bloqueó la unión a receptores Fc utilizando anti-CD16/CD32 (clon2,4G2, Thermo Fisher Scientific) y se tiñeron para los marcadores extracelulares recogidos en el Anexo II durante 40 min en hielo. A continuación, las muestras se fijaron y permeabilizaron utilizando el kit Transcription Factor/Foxp3 Fixation/Permeabilization (Thermo Fisher Scientific) durante 10 min a RT y se tiñeron para los marcadores intracelulares indicados en el Anexo II durante 30 min a RT. Finalmente, las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo espectral Northern Lights (Cytex®, Nueva York, EE.UU.) y los resultados se analizaron utilizando el software FlowJo (Version 10.2; BD Biosciences, San José, EE.UU.).

3.11. Análisis de resultados y estadística

Los resultados obtenidos se representaron mediante gráficos y esquemas diseñados con GraphPad Prism (version 10.1, GraphPad Software Inc., San Diego, EE.UU.). Se realizó análisis descriptivos de tendencia central y dispersión. El análisis estadístico inferencial de los datos generados que seguían una distribución normal se realizó mediante T de Student y ANOVA de una vía, mientras que para los datos no paramétricos se utilizaron los tests de Kruskal-Wallis y Brown-Forysthe. Las diferencias significativas entre las condiciones ensayadas se determinaron mediante los tests de comparaciones múltiples de Tukey para los datos con distribución normal y el de Dunnett para los no paramétricos. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellos valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Optimización de proceso de obtención de un extracto proteico de cacahuete

Ante la ausencia de un protocolo normalizado para la extracción de los alérgenos de cacahuete a partir de harina desgrasada de este fruto seco, se evaluó la capacidad de dos tampones previamente utilizados con éxito, PBS (pH 7,5) y Tris-HCl (pH 8,5), para solubilizar la porción proteica del cacahuete (56). La elección del tampón óptimo se determinó en función del rendimiento del proceso, definido como la relación entre el contenido proteico de la harina inicial y el contenido proteico del extracto final, obtenido tras su dilución en los tampones evaluados a una proporción 1/30 y 1/100 (p/v). La cantidad de proteína total en las muestras se cuantificó mediante las técnicas de análisis elemental y BCA. Los resultados muestran que, cuando la harina de cacahuete es diluida 1/30 (p/v) y 1/100 (p/v) en Tris-HCl a pH 8,5, el rendimiento de extracción es significativamente mayor que con el tampón PBS a pH 7,5 en los dos métodos de cuantificación (análisis elemental y BCA) de proteína total utilizados (Figura 3)

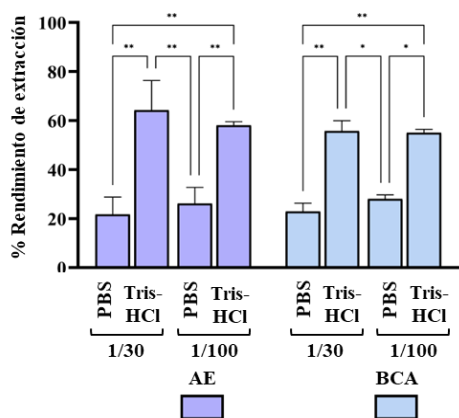


Figura 3. Porcentaje del rendimiento de extracción proteica en la harina de cacahuete desgrasada. Efecto del tipo tampón (PBS, pH 7,5; Tris-HCl, pH 8,5) determinado para las diluciones harina/tampón 1/30 y 1/100 (p/v) utilizando el porcentaje de concentración de proteínas cuantificado en el extracto final respecto al de la harina inicial. La concentración de proteínas se cuantificó mediante el contenido de nitrógeno determinado por análisis elemental (AE) y utilizando el ensayo del ácido bicinonínico (BCA). Los datos representan la media $\pm$ SD (n=2). Diferencias significativas determinadas por ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey para comparaciones dentro de cada método de cuantificación (*p < 0,05; **p < 0,01).

Estos resultados están alineados con estudios previos que mostraron mayores tasas de recuperación proteica cuando el cacahuete era diluido en tampones con pH más básicos (~8) en comparación con aquellos que tenían un pH neutro (57). La solubilidad de las proteínas de los alimentos se favorece cuando el pH del medio de extracción se aleja de su punto isoeléctrico (pI), evitándose la neutralización de las cargas negativas y minimizándose la agregación e insolubilidad de las proteínas (58). Por ello, el tampón Tris-HCl, al tener un pH lo suficientemente alejado de los pIs de los principales alérgenos del cacahuete [Ara h 1 (pI 4,5-5), Ara h 2/3 (pI 5)], puede favorecer su solubilidad al negativizar sus cargas relativas. Para determinar una dilución de la harina de cacahuete

en Tris-HCl que mejorase la extracción de proteínas, se compararon los rendimientos de extracción proteica obtenidos para los ratios 1/30, 1/50, 1/80 y 1/100 (p/v) (Tabla 1; Anexo III).

Tabla 1. Porcentaje del rendimiento de extracción proteica en la harina de cacahuete desgrasada.

Efecto de la dilución harina/tampón Tris-HCl a pH 8,5 (1/30, 1/50, 1/80 y 1/100; p/v) determinado mediante el porcentaje de proteína cuantificado en el extracto final respecto a la concentración de proteína en la harina inicial. La concentración del contenido de proteína cuantificado tanto por el contenido de nitrógeno determinado por análisis elemental (AE) como por el ensayo del ácido bicinonínico (BCA). Los datos representan la media $\pm$ SD (n=3). Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey para las comparaciones entre las diferentes diluciones dentro de cada método de cuantificación.

Ratio harina/tampón (p/v)	% Rendimiento de extracción (AE)	% Rendimiento de extracción (BCA)
1/30	58,1 $\pm$ 1,41	55,05 $\pm$ 1,34
1/50	57,85 $\pm$ 6,15	54,8 $\pm$ 5,79
1/80	62,2 $\pm$ 9,47	59 $\pm$ 8,9
1/100	64,2 $\pm$ 12,16	55,7 $\pm$ 4,24

Se observa una tendencia general en aumento en el rendimiento a medida que aumenta la proporción p/v, siendo las diluciones 1/80 y 1/100 (p/v) las más óptimas para la extracción de proteínas. El ratio 1/100 (p/v) muestra el mayor rendimiento de extracción de los resultados de análisis elemental (64,2 % $\pm$ 9,47), mientras que el ratio 1/80 es el que ofrece el mayor rendimiento de los análisis por BCA (59 % $\pm$ 8,9). Entre las diferentes condiciones evaluadas, se seleccionó la dilución 1/80 (p/v) como la más adecuada para el proceso de extracción de proteínas a partir de harina de cacahuete desgrasada.

Cabe destacar que el análisis elemental determina el contenido total de nitrógeno, lo que puede sobreestimar la cantidad real de proteínas al incluir aminoácidos libres u otros compuestos nitrogenados. En cambio, el ensayo BCA cuantifica específicamente proteínas, lo que le confiere mayor sensibilidad y especificidad. Por este motivo, se otorga una mayor relevancia a los resultados obtenidos por BCA. Además, el ratio 1/80 supone un mayor equilibrio entre eficiencia, consumo de disolvente y reproducibilidad, y su elección se ve respaldada por la experiencia previa del grupo obteniendo extractos enriquecidos en alérgenos de otros frutos secos, como la avellana y el pistacho.

4.2 Validación de la extracción y enriquecimiento de los alérgenos del cacahuete

Tras seleccionar el tampón Tris-HCl a pH 8,5 y el ratio 1/80 (p/v) como las condiciones óptimas para conseguir el mayor rendimiento en la obtención de proteína a partir de la harina de cacahuete desgrasada, se procedió a la validación de la reproducibilidad del

proceso a pequeña escala y a la verificación de la adecuación del protocolo para obtener un extracto enriquecido de los principales alérgenos del cacahuete.

Debido a que las sales del tampón Tris-HCl empleado para la extracción de proteínas pueden impedir alcanzar los pH requeridos para llevar a cabo las hidrólisis enzimáticas e interferir con la viabilidad celular en los ensayos *in vitro* posteriores, se procedió a la diálisis del extracto. La diálisis se realizó utilizando membranas de 10 kDa, lo que permitió eliminar sales conservando los alérgenos de cacahuete presentes en el extracto. La presencia de sales en el filtrado de cada lavado con agua Mili-Q se cuantificó midiendo la conductividad de las sucesivas eluciones (Anexo IV). El proceso de lavado concluyó al observarse una estabilización en la conductividad, sin una disminución adicional apreciable, alcanzando unos valores para los tres extractos de $\sim 10 \mu\text{S}/\text{cm}$.

La caracterización e identificación de alérgenos se llevó a cabo mediante HPLC (Figura 4). El análisis del perfil cromatográfico del extracto de proteínas de cacahuete obtenido permitió identificar tres picos principales correspondientes a los alérgenos Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3, con tiempos de retención aproximados de 56, 53 y 57 minutos respectivamente. Los tiempos de retención son superiores a los reportados por Singh y col. (2016), quienes obtuvieron tiempos de retención en torno a los 14,4 min para Ara h 2, 18,6 min para Ara h 1 y 19,2-21,2 min para Ara h 3 (59). Sin embargo, las relaciones relativas entre los picos e intensidades, tanto en el orden de elución como intensidad, son comparables.

La diferencia en los tiempos de retención se debe principalmente a la programación del gradiente de ambos estudios. En el estudio anteriormente mencionado utilizaron un gradiente lineal y rápido, de 0 a 100% de fase B en menos de 30 min, mientras que en nuestro caso se empleó un gradiente lento y escalonado (0-70% de fase B en 75 min, seguido del 100% en 30 min). Este enfoque más progresivo permite una separación más controlada, aportando una mayor resolución y sensibilidad. Esto es especialmente necesario para este estudio para diferenciar subunidades y fragmentos, como es el caso de Ara h 2 y 3.

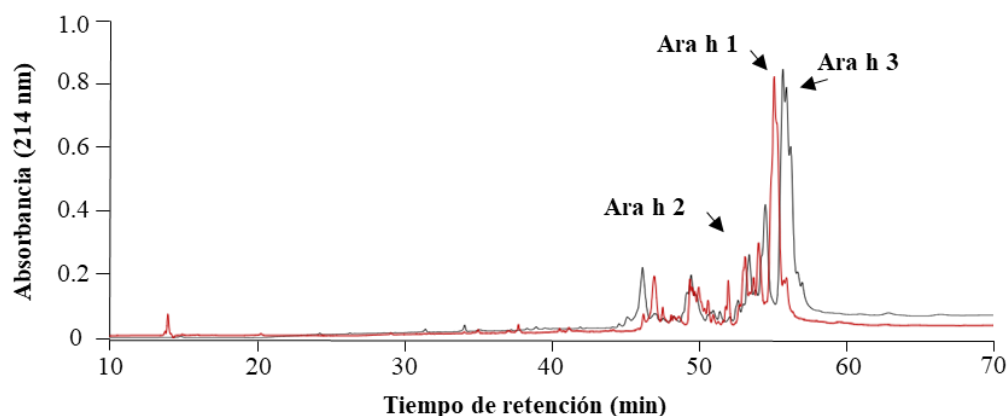


Figura 4. Perfil cromatográfico de los alérgenos de cacahuete. Extracto obtenido a partir de harina desgrasada diluida 1/80 (p/v) en Tris-HCl pH 8,5. Cada color (rojo y negro) identifica una réplica del mismo lote. Se identifican los alérgenos del cacahuete Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3

Si bien las diferencias en el método cromatográfico influyen en los tiempos de retención, el perfil de elución sigue siendo característico de las principales proteínas alérgenas de cacahuete. En ambos estudios, Ara h 1 aparece como el pico principal, indicando una mayor abundancia relativa, mientras que las subunidades de Ara h 2 eluyen antes debido a su mayor hidrofilia (60). Ara h 3 eluye más tarde, pero aparece solapado con Ara h 1, lo que podría atribuirse a la similitud en la hidrofobicidad de ciertas regiones de las dos proteínas (61,62). Para mejorar la resolución en futuros análisis, podría considerarse el uso de metanol como fase orgánica en lugar de acetonitrilo como ocurre en el estudio comparativo, o bien optimizar la pendiente del gradiente.

La limitada resolución y sensibilidad de identificación de todos los alérgenos de cacahuete relevantes mediante RP-HPLC requiso de su análisis mediante SDS-PAGE (Figura 5), en el cual sí se muestran los alérgenos predominantes. El perfil electroforético observado en la Figura 5 es consistente con el reportado por Pitre y col. (63), evidenciando la presencia de los principales alérgenos de cacahuete (Anexo I). Entre ellos, se identifica Ara h 1, con un peso molecular de aproximadamente 62 kDa; Ara h 2, del cual se distinguen sus dos isoformas: Ara h 2.01 (17 kDa) y Ara h 2.02 (19 kDa); y Ara h 3/4. En este último caso, se observan fragmentos correspondientes a la subunidad básica en las bandas de 21 y 24 kDa, mientras que la subunidad ácida se detecta en fragmentos de 29 a 37 kDa. Estos fragmentos escindidos son originados como resultado de la proteólisis endógena de manera natural en el cacahuete (11,63). Por otro lado, las proteínas de almacenamiento de tipo albúmina (Ara h 6 y Ara h 7), se corresponden a las bandas de 14 y 15 kDa. No se observan los alérgenos menores a 10 kDa (como Ara h 9) debido a su eliminación al

realizar los lavados de sales con un Amicon® Ultra de corte de filtro molecular de 10 kDa. Esta aproximación permitió observar una mayor cantidad de alérgenos de cacahuete a partir de la harina desgrasada en comparación con el análisis por RP-HPLC.

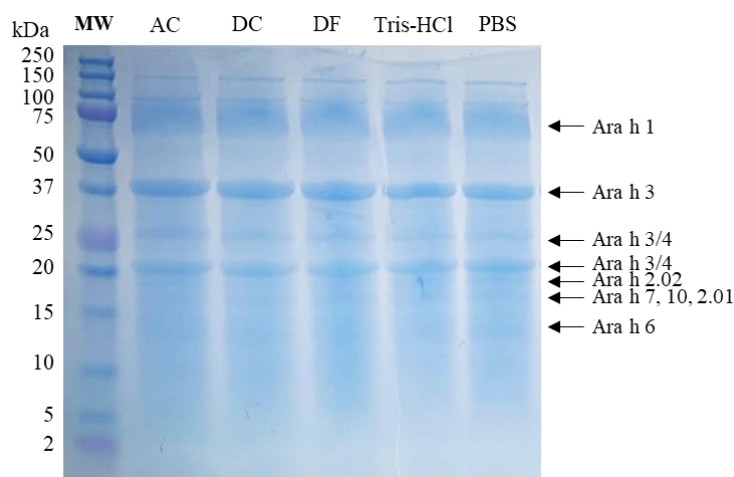


Figura 5. Análisis por SDS-PAGE del aislado proteico de cacahuete durante las distintas etapas del protocolo de extracción. Análisis electroforético de los principales alérgenos del cacahuete en un gel Bis-Tris de las muestras recogidas a lo largo del proceso de solubilización de la harina de cacahuete desgrasada antes (AC) y después (DC) de centrifugarlas, tras su filtrado (DF) y después de eliminar las sales, liofilizar y reconstituir el extracto liofilizado en el tampón de extracción Tris-HCl a pH 8,5 (Tris-HCl) y PBS a pH 7,5 (PBS). Se identifican las principales proteínas alergénicas del cacahuete (Ara h). MW: marcador de peso molecular.

Para obtener una cantidad suficiente del aislado proteico de cacahuete para su empleo en los distintos ensayos experimentales posteriores, se procedió al escalado del proceso de extracción (Anexo V). La cuantificación mediante el ensayo BCA mostró un rendimiento proteico del 57,7 % (mg proteína/mg extracto liofilizado) en el proceso a gran escala. Además, el perfil proteico resultante fue equivalente al obtenido en el proceso a pequeña escala (Anexo VI), lo que valida la reproducibilidad del proceso tras el escalado.

Aunque aún no se han encontrado evidencias concretas sobre la contaminación de LPS en el cacahuete, sí que algunos estudios han elucidado la presencia de esta endotoxina en productos de origen vegetal en polvo dentro de la industria alimentaria y medicinal (64). El LPS es una endotoxina capaz de activar las células del sistema inmunológico mediante su unión al receptor TLR4 presente en su superficie. Esto induce respuestas inespecíficas del tipo T_H1 e impide la identificación y caracterización de las respuestas T_H2 que son específicamente inducidas por los alérgenos alimentarios (65). Por esta razón, los extractos obtenidos se sometieron a un protocolo de eliminación del LPS contaminante utilizando columnas comerciales (Detoxi-gel® Endotoxin Removing Columns). A continuación, la cuantificación de los niveles de LPS bacteriano en las muestras se realizó

mediante el ensayo Quanti-Blue, en el que se detectan los niveles de fosfatasa alcalina secretada por las células THP1-Blue™ en respuesta a la unión del LPS al receptor TLR4. Los niveles de LPS de las distintas eluciones por la columna se reflejan en la Figura 6.

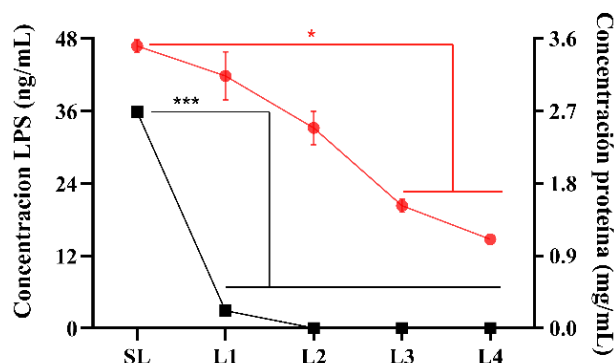


Figura 6. Determinación de la concentración de lipopolisacárido (LPS) y proteínas totales en el extracto de cacahuete. Contenido de LPS (línea negra, eje Y izquierdo) y proteínas (línea naranja, eje Y derecho) durante el proceso de eliminación de endotoxinas contaminantes del extracto de cacahuete antes (SL) y tras los lavados secuenciales (L1–L4). Los datos representan la media $\pm$ SD (n=2). Diferencias determinadas por ANOVA de una vía seguido del test de Tukey (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Los resultados muestran una alta eficacia en la reducción de la contaminación por LPS del extracto de cacahuete tras el primer lavado, mostrándose una disminución significativa de esta endotoxina al comparar la muestra inicial (35,83 ng/mL) con la primera a primera elución (2,91 ng/mL) y todos lavados posteriores (< límite de detección). Estos valores tan disminuidos sugieren una reducida susceptibilidad del cacahuete a la contaminación por endotoxinas. Esto puede explicarse por la presencia de capas protectoras características de las leguminosas, las cuales actúan como barreras físicas frente a la contaminación microbiana (66). Uno de los inconvenientes de utilizar columnas Detoxi-gel® es la posibilidad de que se produzcan uniones inespecíficas, suponiendo la retención de proteínas del extracto en la columna y pérdida de recuperación proteica. Esto ocurre especialmente en proteínas hidrofóbicas como Ara h 1 y 3 (67). Por esta razón, se evaluó la reducción de la concentración proteica durante las sucesivas eluciones. Los resultados de cuantificación del contenido proteico en las muestras recogidos en la Figura 6 muestran una disminución significativa a partir del tercer lavado (1,1 mg/mL) comparado con la solución inicial (3,5 mg/mL).

Los valores de LPS obtenidos a partir del segundo lavado son óptimos para la realización de ensayos *in vitro* posteriores, por lo que este punto se considera el más óptimo para finalizar el proceso de descontaminación. De este modo, se asegura una eliminación eficaz de endotoxinas sin comprometer significativamente la recuperación proteica, lo

que permite conservar la integridad funcional del extracto.

4.3 Generación de hidrolizados enzimáticos de los alérgenos de cacahuete

Con el objetivo de generar hidrolizados de cacahuete enriquecidos en péptidos hipoalergénicos e inmunomodulantes se utilizaron las enzimas tripsina, quimiotripsina y pepsina. La influencia del tiempo de hidrólisis fue monitorizada mediante el muestreo a lo largo de la reacción, con el propósito de determinar el momento óptimo para su evaluación funcional posterior.

En una primera aproximación, se realizó una electroforesis en gel de Tris-Tricina para analizar el perfil peptídico de los hidrolizados generados con tripsina (Anexo VII). Sin embargo, esta técnica resultó poco adecuada debido al reducido tamaño de los péptidos. Ante esta limitación, se optó por analizar los hidrolizados mediante RP-HPLC, una técnica más sensible y precisa para monitorizar la evolución del proceso de hidrólisis (68). Este enfoque permitió estudiar de forma comparativa el perfil peptídico de cada enzima a lo largo del tiempo (Anexos VIII, IX y X). Los resultados obtenidos evidenciaron la importancia del tiempo hidrolisis en la desaparición de las proteínas nativas presentes en el extracto de partida, mostrando la presencia de alérgenos intactos en los tiempos más cortos que se evaluaron tanto para la pepsina (10 min, 30 min y 60 min; Anexo VIII) como para tripsina y quimiotripsina (30 min y 2h; Anexos IX y X). A medida que el tiempo de incubación fue aumentado, se apreció la desaparición progresiva de proteína nativa, la reducción de péptidos hidrofóbicos y el aumento de péptidos hidrofílicos con menor tiempo de retención en los hidrolizados. El perfil cromatográfico de los productos de hidrolisis mostró la ausencia de proteína nativa a partir de las 18h para todas las enzimas (Anexos VIII, IX y X).

La degradación completa de las proteínas nativas observadas en nuestro estudio coincide con lo descrito por Arribas y col. (2024), quienes combinaron tratamientos térmicos, de alta presión y una hidrólisis enzimática secuencial para favorecer la digestión de proteínas de distintos frutos secos (69). En nuestro caso, no fueron necesarios tratamientos previos, posiblemente debido al mayor tiempo de incubación utilizado y por un protocolo de extracción que, posiblemente, desestabilizó parcialmente la estructura proteica, facilitando así su degradación. Esto es especialmente beneficioso en términos de seguridad, ya que no requiere el uso de sustancias potencialmente dañinas (70). Por otro

lado, la necesidad de condiciones específicas y prolongadas de hidrólisis es coherente con la elevada resistencia a la degradación gastrointestinal que presentan los alérgenos del cacahuete, uno de los principales factores que contribuyen a su alta alergenicidad (13,71). Por tanto, lograr una degradación efectiva de estas proteínas altamente resistentes requiere de concentraciones elevadas de enzimas digestivas, condiciones concretas de hidrólisis y tiempos de incubación prolongados.

En la Figura 5 se muestran los perfiles cromatográficos de los hidrolizados con pepsina, tripsina y quimiotripsina generados a las 18h y 24h (en negro) y del extracto de cacahuete de partida (azul).

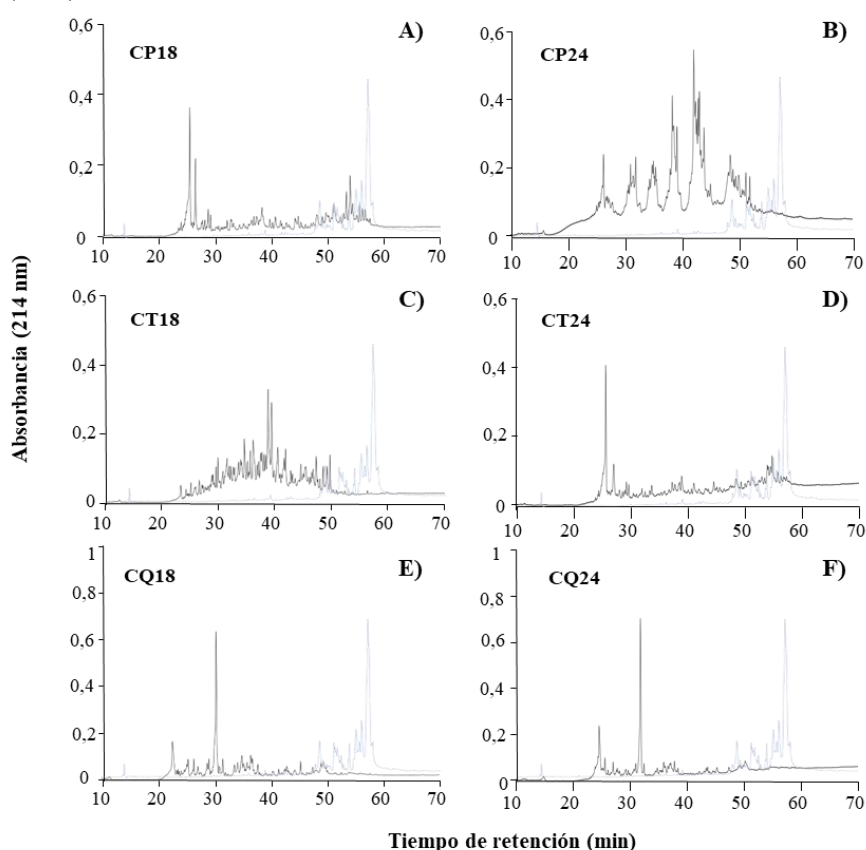


Figura 7. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC de los hidrolizados de cacahuete tras digestión enzimática (negro). El perfil en azul corresponde al extracto de cacahuete sin hidrolizar (proteína nativa) y se presenta como referencia en cada gráfico. (A) Pepsina 18h, CP18; (B) Pepsina 24h, CP24; (C) Tripsina 18 h, CT18; (D) Tripsina 24h, CT24; (E) Quimiotripsina 18h, CQ18; (F) Quimiotripsina 24h, CQ24.

Estos resultados muestran la desaparición de los alérgenos nativos del extracto de cacahuete de partida a partir de las 18 h de hidrólisis y se evidencia el aumento de péptidos hidrofílicos que eluyen a tiempos de retención cortos (<45 min). El aumento en la hidrofilia se produce debido a la exposición de los grupos funcionales ($-\text{COOH}$ y $-\text{NH}_2$) durante la hidrólisis, lo que incrementa la solubilidad de los péptidos (72).

En el caso de la pepsina (Figura 5A), se observó una gran variedad de péptidos con tiempos de retención menores que los de los alérgenos intactos presentes en el perfil del extracto de cacahuete de partida (azul), comportamiento que evidencia la eficiencia de la reacción enzimática desarrollada. A las 18 h, la presencia de un pico a los 25 minutos con una intensidad de señal de absorbancia de 0,4 indica una alta proporción de péptidos hidrofílicos. Sorprendentemente, en el perfil de las 24 h (Figura 5B), en lugar de concentrarse la señal en un pico dominante correspondiente a péptidos de un tamaño o tipo mayoritario, se aprecia una amplia diversidad de picos. Esto se debe probablemente a una menor especificidad de la pepsina o a la aparición de productos de auto-digestión provenientes de la propia enzima que se producen tras tiempos de incubación prolongados. La pepsina, principal enzima digestiva del estómago, inicia la degradación proteica y suele durar su acción entre 2 y 3 h tras la ingesta. Además, estudios *in vitro* han demostrado que su actividad enzimática es rápida (73), lo que respalda la observación de que, a las 24 horas, la pepsina pueda generar productos de autohidrólisis al no contar con más sitios de corte en el extracto (74).

Respecto a la tripsina, a las 18 h se detectaron una mayor diversidad de picos (Figura 5C), lo que indica una amplia generación de péptidos. En cambio, a las 24 h (Figura 5D) predomina el pico a los 25 min, también con una intensidad de señal de 0,4, lo cual sugiere una población de péptidos más pequeños y menos diversa. Este comportamiento es coherente con una enzima cuya actividad es específica y que, una vez completada su acción, no sigue generando nuevos productos en gran medida. A las 24 h se observan picos con el mismo tiempo de retención que el extracto, pero no se corresponde con los alérgenos intactos ya que a las 18 horas no se observa ningún solapamiento. Estos tiempos de hidrólisis con tripsina son tan elevados debido a la presencia de dominios inhibidores de tripsina en alérgenos mayoritarios como Ara h 6 (75).

En el caso de la quimiotripsina, los perfiles tras 18 h y 24 h de incubación son bastante similares, aunque se observan ciertos matices (Figuras 5E y F). A las 24 h, el pico presente a los 30 min en el perfil de las 18 h muestra un leve desplazamiento hacia la derecha, lo que podría reflejar ligeros cambios en la hidrofobicidad de los péptidos generados. Además, se aprecia un aumento en el pico a los 25 minutos, el cual probablemente corresponde a la acumulación de péptidos estables o resistentes a una degradación adicional. Según lo mostrado en el Anexo VIII, este pico experimenta un aumento más

marcado a las 48 h, lo que sugiere una acción hidrolítica más progresiva.

Si bien las tres enzimas generan mezclas complejas y heterogéneas de péptidos, los análisis realizados mostraron que persisten restos de proteína intacta, especialmente en los hidrolizados obtenidos con pepsina. Esta conservación parcial del extracto íntegro podría suponer la presencia de epítomos de IgE específicos de alérgeno intactos. En este sentido, si se mantienen estas secuencias reconocibles por las IgE, los hidrolizados seguirían desencadenando una respuesta alérgica similar a la provocada por las inmunoterapias orales convencionales basadas en el alérgeno intacto. Este tipo de inmunoterapias se asocian muy frecuentemente con reacciones adversas, repercutiendo negativamente en la adherencia al tratamiento (36,76). Para los ensayos de inmunomodulación se seleccionaron los hidrolizados de pepsina y tripsina a las 24 horas por la gran variedad de péptidos generados y de quimiotripsina a las 18 horas con la finalidad de evitar la acumulación de péptidos pequeños repetidos presentes a las 24 horas

4.4 Reducción de la capacidad de unión de IgE específica en los hidrolizados de cacahuete producidos con pepsina, tripsina y quimiotripsina.

Con el fin de determinar la alergenicidad de los hidrolizados generados y poder identificar aquellos más hipoalergénicos, se llevaron a cabo ELISAs de inhibición utilizando sueros de pacientes pediátricos alérgicos al cacahuete (Figura 6). Este ensayo permitió determinar la capacidad de unión de los péptidos presentes en los hidrolizados a las IgE específicas basado en la incubación de los sueros con los hidrolizados. Durante esta incubación, si hay fragmentos peptídicos reconocibles por las IgE específicas presentes en el suero, se secuestraran estas moléculas de IgE impidiendo su unión a los alérgenos de cacahuete inmovilizado en la placa de ELISA. Por tanto, cuanto mayor sea la alergenicidad del hidrolizado, menor serán los valores de absorbancia cuantificados en el ELISA durante la lectura de la placa.

Mediante diluciones seriadas de las muestras analizadas, se determinó el valor de EC₅₀, definido como la concentración de proteína necesaria para inhibir el 50 % de la unión máxima entre las IgE y los alérgenos de cacahuete inmovilizados en la placa de ELISA. Valores bajos de EC₅₀ se asocian a una mayor capacidad de la muestra analizada para unirse a la IgE específica presente en el suero y, por tanto, una mayor alergenicidad. En cambio, valores altos de EC₅₀ indica que se requiere una mayor concentración del

hidrolizado para alcanzar ese nivel de inhibición, reflejando menor potencial alergénico.

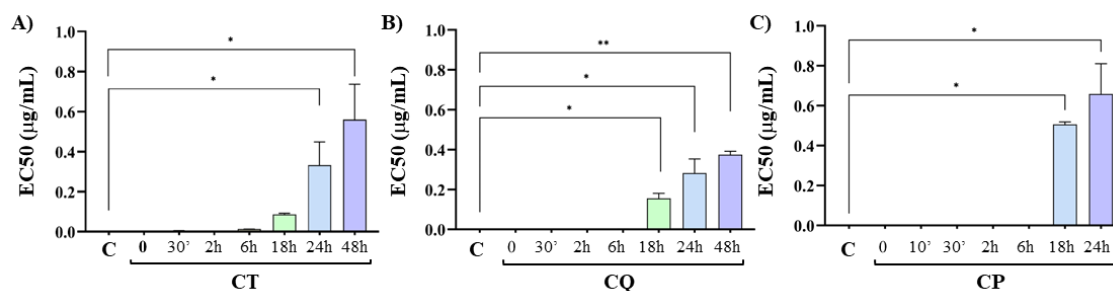


Figura 8. Unión a IgE específica de cacahuete de sujetos alérgicos. Valores de EC50 ($\mu\text{g/mL}$) del extracto de cacahuete (C) y sus hidrolizados obtenidos con tripsina (A; CT), quimiotripsina (B; CQ) y pepsina (C; CP) durante los tiempos 0, 30 min (30'), 2h, 6h, 18h y 24h. Para CT y CQ también se ensayó 48h y, para CP, 10 min (10'). Duplicados técnicos obtenidos con un pool de sueros de tres pacientes alérgicos al cacahuete (media $\pm$ SEM; $n=3$). Diferencias significativas determinadas por el Kruskal-Wallis seguido de comparaciones múltiples con el C empleando el test de Dunn's (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). EC50: concentración efectiva media.

Los resultados obtenidos demostraron la propiedad hipoalergénica de los hidrolizados, especialmente a medida que aumenta el tiempo de incubación de las tres enzimas con el extracto. En el caso de la tripsina, a las 6 h comienza a observarse un aumento de la EC50 frente a las condiciones previas (0, 30 min y 2h), ascendiendo a un valor de $0,86 \mu\text{g/mL}$ a las 18 horas; $0,33 \mu\text{g/mL}$ a las 24 horas ($p < 0,05$) y, finalmente, $0,56 \mu\text{g/mL}$ a las 48 horas ($p < 0,05$). Estos valores son similares a los obtenidos para la quimiotripsina, cuyas EC50 fueron de $0,15 \mu\text{g/mL}$ a las 18 horas, $0,28 \mu\text{g/mL}$ a las 24 horas ($p < 0,05$) y $0,37 \mu\text{g/mL}$ a las 48 horas ($p < 0,01$). En el caso de la pepsina, el aumento de la EC50 es menos progresiva, requiriendo de $0,5 \mu\text{g/mL}$ y $0,65 \mu\text{g/mL}$ de CP24h y CP48h respectivamente para inhibir el 50% de la unión de las IgE al extracto ($p < 0,05$). Estas últimas condiciones son las más óptimas en términos de hipoalergenicidad. En este sentido, aunque los perfiles cromatográficos por RP-HPLC de las hidrólisis con pepsina podrían sugerir una conservación de epítomos reactivos frente a las IgE específicas del alérgeno, los ensayos funcionales demuestran la pérdida efectiva de los mismos, confirmando su carácter hipoalergénico.

Los resultados adquiridos para las tres enzimas concuerdan con los reportados por Lozano-Ojalvo y col. (2016) (77), quienes emplearon un ELISA de inhibición para evaluar la alergenicidad de hidrolizados de proteína de clara de huevo. En su estudio, observaron un incremento en la señal del ELISA con tiempos de incubación crecientes de hidrólisis, indicando una disminución en la competencia por unión a las IgE y, en consecuencia, una pérdida de epítomos alergénicos. La eliminación significativa de

epítomos no solo disminuirá la probabilidad de reacciones adversas en sujetos sensibilizados tratados por su incapacidad de llevar a cabo el enlace cruzado con las IgE, sino que también favorece una mayor adherencia al tratamiento y, por ende, la posibilidad de adquirir la tolerancia oral permanente (41,50). Por tanto, los resultados adquiridos en este estudio resultan prometedores para lograr un tratamiento seguro y efectivo para la alergia al cacahuete.

3.5. Propiedades inmunomodulantes de los hidrolizados de cacahuete seleccionados

En base al perfil cromatográfico de los hidrolizados generados determinado mediante RP-HPLC, prestando especial atención a la heterogenicidad de los péptidos constituyentes, y a la reducción de la alergenicidad determinada por la disminución de su capacidad de unión a IgE cuantificada con ELISAs de inhibición, se seleccionaron como candidatos para evaluar su capacidad inmunomodulante: los hidrolizados de pepsina y tripsina obtenidos a las 24 h (CP24 y CT24) y el producido con quimiotripsina a las 18 h (CQ18). Para ello, se utilizó un modelo *ex vivo* de esplenocitos procedentes de ratones sensibilizados intraperitonealmente al cacahuete. Las células aisladas fueron incubadas con el extracto de cacahuete libre de LPS exclusivamente o en presencia de los hidrolizados seleccionados. Tras 72 h, las células fueron recogidas y caracterizadas fenotípicamente mediante citometría de flujo espectral en base a la expresión de marcadores de superficie CCR4, CCR6 y CXCR3 (para identificar las células alergénicas T_H2) y del factor de transcripción intranuclear Foxp3 (para la identificación de las Tregs).

La Figura 7 muestra las poblaciones celulares tras su estimulación con el extracto y con extracto junto con los hidrolizados. Los resultados mostraron que la estimulación con el extracto de cacahuete aumentó el porcentaje de células T_H2 ($CD4^+CCR6^+CXCR3^+CCR4^+$) en comparación con el control negativo (CTRL) de células no estimuladas, pasando de un 1,11% al 10,74% ($p<0,0001$). (Figura 7A). Estos datos son coherentes con lo esperado, ya que la estimulación de las células con el alérgeno desencadena la respuesta inflamatoria de tipo T_H2 (27). Sin embargo, la incubación de esplenocitos con el extracto intacto (C) en presencia del hidrolizado con quimiotripsina (C+CQ18), tripsina (C+CT24) y pepsina (C+CP24), redujo significativamente los niveles. Del 10,74% de la estimulación con el extracto, el porcentaje de células T_H2 disminuyó a un 2,89 % en la condición con el hidrolizado de quimiotripsina, un 4,98 % para la tripsina y un 1,35 % para la pepsina ($p<0,0001$). Estos resultados evidencian la capacidad de los péptidos presentes en los tres

hidrolizados para suprimir la diferenciación promovida por el alérgeno hacia este fenotipo. La mayor reducción se dio con los hidrolizados de pepsina, siendo la que ofrece un efecto inmunomodulador más potente, seguido de la quimiotripsina y tripsina en último lugar.

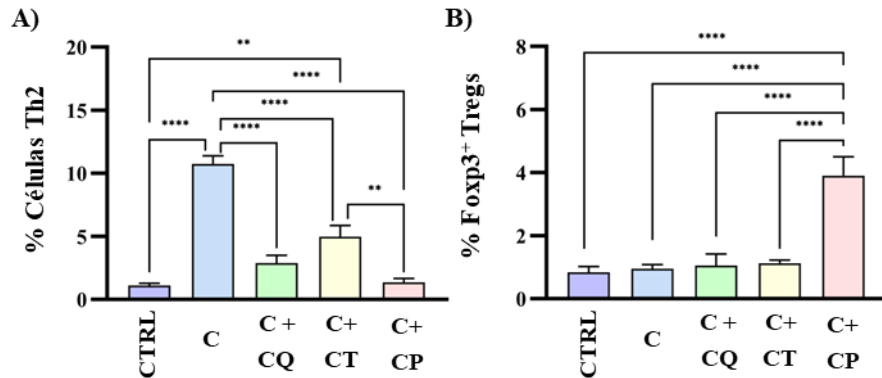


Figura 9. Propiedades inmunomodulantes de los hidrolizados de cacahuete. Porcentaje de células T_H2 (A) y T reguladoras (Tregs; B) identificadas como $CCR6^+CXCR3^-CCR4^+$ y $Foxp3^+$, respectivamente, dentro del total de células T $CD4^+$. Los esplenocitos aislados de ratones BALB/c sensibilizados a cacahuete (n=5) fueron incubados en ausencia de estímulos (CTRL), con el extracto de cacahuete (C; 200 mg/mL) y con el extracto junto con los hidrolizados generados con tripsina a 24 h (C+CT; 200 mg/mL), quimiotripsina a 18 h (C+CQ; 200 mg/mL) y pepsina a 24 h (C+CP; 200 mg/mL). Diferencias significativas determinadas por ANOVA de una vía seguido del test de Tukey para las comparaciones entre las condiciones (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$).

Por otro lado, la incubación de los esplenocitos con los tres hidrolizados (CQ18, CT24 y CP24) promovió un aumento de células $CD4^+Foxp3^+$ Tregs en comparación tanto con el control como con el propio extracto de cacahuete (Figura 7B). El aumento más notorio fue producido por CP24 ascendiendo a un 3,9 % frente al 0,95 % del control ($p < 0,0001$).

La reducción de las células T_H2 constituye un paso fundamental en la modulación de la respuesta alérgica, ya que las citoquinas liberadas por las mismas desempeñan un papel clave en varios procesos: inhiben la generación de células Tregs $Foxp3^+$, favorecen la diferenciación de las células B *naïve* en células B de memoria y células plasmáticas productoras de IgE específica y promueven reclutamiento y activación de eosinófilos y basófilos (29). Por tanto, el efecto observado en este estudio resulta esencial para lograr un tratamiento eficaz contra la alergia al cacahuete, al contribuir al establecimiento de un entorno inmunológico antiinflamatorio, promover la desensibilización y favorecer la generación de respuestas tolerogénicas.

Asimismo, los resultados obtenidos son coherentes con lo descrito en estudios previos con otros alérgenos alimentarios, como el realizado por Lozano-Ojalvo y col. (2016). En su estudio, evaluaron la producción de citoquinas de tipo TH2 (IL-4, IL-5 e IL-13) tras la

estimulación de PBMCs (células mononucleares de sangre periférica, del inglés “*Peripheral blood mononuclear cells*”) obtenidos de pacientes alérgicos al huevo con hidrolizados enzimáticos de alérgenos de clara de huevo (53). Demostraron que los hidrolizados de ovoalbúmina y ovomucoide obtenidos mediante hidrólisis con pepsina fueron capaces de reducir significativamente la liberación de IL-5 e IL-13 en comparación con las proteínas intactas. No obstante, los hidrolizados con alcalasa mostraron un efecto aún más pronunciado, lo que sugiere que esta enzima podría ser una opción prometedora para futuras investigaciones centradas en la reducción de la respuesta T_H2 . Por otro lado, los resultados de la promoción de células Tregs coinciden con los observados por Lozano-Ojalvo y col. (2019) (78), quienes demostraron que la estimulación de cultivos *in vitro* con hidrolizados de ovoalbúmina generados con pepsina favorece el desarrollo de Tregs $Foxp3^+ ROR\gamma^t^+$. Estos hallazgos refuerzan el potencial inmunomodulador de los péptidos derivados de alérgenos alimentarios.

En conclusión, los hidrolizados enzimáticos de pepsina, tripsina y quimiotripsina producidos a partir de harina desgrasada de cacahuete suponen una estrategia potencial para inducir tolerancia inmunológica mediante mecanismos que favorecen el equilibrio T_H1/T_H2 y la generación de Tregs. Concretamente, considerando su capacidad para reducir en gran medida la proporción de células T_H2 y aumentar significativamente la población de células Tregs, el hidrolizado del extracto de cacahuete generado con pepsina a las 24 h (CP24) se identifica como la mejor opción de entre todas las evaluadas. Al combinar una alergenidad reducida con propiedades inmunomodulantes favorables para reducir las respuestas alérgicas y promover las reguladoras, se muestra como un posible candidato para emplearlos en estudios pre-clínicos y en humanos para evaluar sus propiedades terapéuticas y beneficios en la inducción de la tolerancia oral a los alérgenos del cacahuete.

5. CONCLUSIONES

En el presente Trabajo de Fin de Grado se ha logrado optimizar un proceso de obtención de un extracto proteico de cacahuete enriquecido de sus principales alérgenos que ha sido caracterizado mediante técnicas electroforéticas (SDS-PAGE) y cromatográficas (RP-HPLC). Este extracto se ha empleado para la producción de hidrolizados enzimáticos utilizando pepsina, tripsina y quimiotripsina. La alergenicidad de los hidrolizados obtenidos mediante la evaluación de la su capacidad de unión de sus péptidos a la IgE específica humana. Finalmente, las propiedades inmunomodulantes de los hidrolizados seleccionados se determinó por la capacidad de sus péptidos para reducir la expansión de células T_H2 y promover Tregs en cultivos *in vitro* de esplenocitos obtenidos de ratones sensibilizados a cacahuete.

En base a los resultados obtenidos, las dos principales conclusiones derivadas de este trabajo son:

- 1 El empleo de las condiciones optimizadas para la obtención de un extracto de los principales alérgenos del cacahuete, consistente en la dilución 1/80 (p/v) de la harina desgrasada en tampón Tris-HCl a pH 8,5, permite la producción de hidrolizados enzimáticos libres de proteína intacta y enriquecidos en péptidos hidrofílicos tras 18 h de incubación con pepsina, tripsina y quimiotripsina.
- 2 Los hidrolizados generados con tripsina y pepsina tras 24 h de reacción y con quimiotripsina a partir de 18 h contienen péptidos con propiedades hipoalergénicas que muestran una baja capacidad de unión a la IgE específica de cacahuete, y con capacidad inmunomodulante, pudiendo impedir la expansión de células T_H2 inducidas por el alérgeno en esplenocitos procedentes de ratones alérgicos al cacahuete y promover la expansión de células Tregs con un fenotipo tolerogénico en estas células.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barni S, Liccioli G, Sarti L, Giovannini M, Novembre E, Mori F. Immunoglobulin E (IgE)-mediated food allergy in children: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *Medicina (Lithuania)* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2025 May 24];56(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32143431/>
2. Liu EG, Yin X, Swaminathan A, Eisenbarth SC. Antigen-Presenting Cells in Food Tolerance and Allergy. *Front Immunol* [Internet]. 2021 Jan 8 [cited 2025 May 24];11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33488627/>
3. Waserman S, Bégin P, Watson W. IgE-mediated food allergy. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* [Internet]. 2018 Sep 12 [cited 2025 May 24];14(Suppl 2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30263035/>
4. Bartha I, Almulhem N, Santos AF. Feast for thought: A comprehensive review of food allergy 2021-2023. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [Internet]. 2024 Mar 1 [cited 2025 May 24];153(3):576–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38101757/>
5. Croote D, Quake SR. Food allergen detection by mass spectrometry: the role of systems biology. *npj Systems Biology and Applications* 2016 2:1 [Internet]. 2016 Sep 29 [cited 2025 May 24];2(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/npjbsa201622>
6. Bianco M, Ventura G, Calvano CD, Losito I, Cataldi TRI. Food allergen detection by mass spectrometry: From common to novel protein ingredients. *Proteomics* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2025 May 24];23(23–24). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37691088/>
7. Spolidoro GCI, Ali MM, Amera YT, Nyassi S, Lisik D, Ioannidou A, et al. Prevalence estimates of eight big food allergies in Europe: Updated systematic review and meta-analysis. *Allergy* [Internet]. 2023 Sep 1 [cited 2025 Jun 17];78(9):2361–417. Available from: [/doi/pdf/10.1111/all.15801](https://doi/pdf/10.1111/all.15801)
8. Chong KW, Turner PJ. Peanut Allergy - No Longer a Life Sentence. *Acta Med Acad* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2025 Jun 17];49(2):198–206. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33189125/>
9. Walczyk NE, Smith PMC, Tovey ER, Roberts TH. Peanut protein extraction conditions strongly influence yield of allergens Ara h 1 and 2 and sensitivity of

- immunoassays. Food Chem [Internet]. 2017 Apr 15 [cited 2025 Jun 17];221:335–44. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814616316806?via%3Dihub>
10. Sampson HA. Food allergy: Past, present and future. Allergology International [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2025 Jun 17];65(4):363–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1323893016301137?via%3Dihub>
11. Palladino C, Breiteneder H. Peanut allergens. Mol Immunol [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2025 Jun 17];100:58–70. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589018301226>
12. Scurlock AM, Burks AW. Peanut allergenicity. Annals of Allergy, Asthma and Immunology [Internet]. 2004 [cited 2025 Jun 17];93(5 SUPPL.). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15562869/>
13. Palladino C, Breiteneder H. Peanut allergens. Mol Immunol [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2025 Jun 23];100:58–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29680589/>
14. Viquez OM, Konan KN, Dodo HW. Structure and organization of the genomic clone of a major peanut allergen gene, Ara h 1. Mol Immunol [Internet]. 2003 [cited 2025 Jun 23];40(9):565–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14597159/>
15. Viquez OM, Konan KN, Dodo HW. Structure and organization of the genomic clone of a major peanut allergen gene, Ara h 1. Mol Immunol [Internet]. 2003 [cited 2025 Jun 17];40(9):565–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14597159/>
16. Ballmer-Weber BK, Lidholm J, Fernandez-Rivas M, Seneviratne S, Hanschmann K m, Vogel L, et al. IgE recognition patterns in peanut allergy are age dependent: perspectives of the EuroPrevall study. Allergy. 2015;70:391–407.
17. Hemmings O, Du Toit G, Radulovic S, Lack G, Santos AF. Ara h 2 is the dominant peanut allergen despite similarities with Ara h 6. J Allergy Clin Immunol [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2025 Jun 17];146(3):621. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7482438/>
18. Marini-Rapoport O, Fernández-Quintero ML, Keswani T, Zong G, Shim J,

- Pedersen LC, et al. Defining the cross-reactivity between peanut allergens Ara h 2 and Ara h 6 using monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2024 Apr 1 [cited 2025 Jun 17];216(1):25. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10929694/>
19. Foo ACY, Mueller GA. Abundance and Stability as Common Properties of Allergens. *Frontiers in Allergy* [Internet]. 2021 Oct 28 [cited 2025 Jun 23];2:769728. Available from: www.frontiersin.org
20. Breiteneder H, M. ENC. Food Allergens—Molecular and Immunological Characteristics. *Food Allergy: Adverse Reactions to Foods and Food Additives: Fifth Edition* [Internet]. 2014 Feb 24 [cited 2025 Jun 17];47–67. Available from: [/doi/pdf/10.1002/9781118744185.ch4](https://doi.org/10.1002/9781118744185.ch4)
21. Scheurer S, Toda M, Vieths S. What makes an allergen? *Clinical and Experimental Allergy* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2025 Jun 17];45(7):1150–61. Available from: [/doi/pdf/10.1111/cea.12571](https://doi.org/10.1111/cea.12571)
22. Rezende RM, Weiner HL. Oral tolerance: an updated review. *Immunol Lett* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2025 May 24];245:29–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35395272/>
23. Leung DYM., Akdis CA., Bacharier LB., Cunningham-Rundles Charlotte, Sicherer SH., Sampson HA. *Pediatric allergy : principles and practice*. 2021;409.
24. Lozano-Ojalvo D, Berin C, Tordesillas L. Immune basis of allergic reactions to food. *J Investig Allergol Clin Immunol* [Internet]. 2019 [cited 2025 May 24];29(1):1–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30457106/>
25. Sampson HA, O'Mahony L, Burks AW, Plaut M, Lack G, Akdis CA. Mechanisms of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2025 May 24];141(1):11–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29307410/>
26. Yu W, Freeland DMH, Nadeau KC. Food allergy: Immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2016 Nov 25 [cited 2025 May 24];16(12):751–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27795547/>
27. Ogulur I, Mitamura Y, Yazici D, Pat Y, Ardicli S, Li M, et al. Type 2 immunity in allergic diseases. *Cellular & Molecular Immunology* 2025 22:3 [Internet]. 2025 Feb 17 [cited 2025 May 24];22(3):211–42. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41423-025-01261-2>

28. Xi C, Li W, Liu X, Xie J, Li S, Tian Y, et al. The Potential Role of *Moringa oleifera* Lam. Leaf Proteins in Moringa Allergy by Functionally Activating Murine Bone Marrow-Derived Dendritic Cells and Inducing Their Differentiation toward a Th2-Polarizing Phenotype. *Nutrients* [Internet]. 2024 Jan 1 [cited 2025 May 24];16(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38201837/>
29. Anvari S, Miller J, Yeh CY, Davis CM. IgE-Mediated Food Allergy. *Clin Rev Allergy Immunol* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2025 May 24];57(2):244–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30370459/>
30. Angkasekwinai P. Th9 Cells in Allergic Disease. *Curr Allergy Asthma Rep* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2025 May 24];19(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30915580/>
31. Kindt TJ, GRA, & OBA. Kindt, T. J., Goldsby, R. A., & Osborne, B. A. (2007). *Kuby Immunology* (6.^a ed.). New York: W. H. Freeman. 6.^a ed. New York: W. H. Freeman.; 2007.
32. Peters RL, Krawiec M, Koplin JJ, Santos AF. Update on food allergy. *Pediatric Allergy and Immunology* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2025 May 24];32(4):647–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33370488/>
33. Gargano D, Appanna R, Santonicola A, De Bartolomeis F, Stellato C, Cianferoni A, et al. Food allergy and intolerance: a narrative review on nutritional concerns. *Nutrients* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2025 May 24];13(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34068047/>
34. Riggioni C, Oton T, Carmona L, Du Toit G, Skypala I, Santos AF. Immunotherapy and biologics in the management of IgE-mediated food allergy: Systematic review and meta-analyses of efficacy and safety. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* [Internet]. 2024 Aug 1 [cited 2025 May 24];79(8):2097–127. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38747333/>
35. Pouessel G, Lezmi G. Oral immunotherapy for food allergy: Translation from studies to clinical practice? *World Allergy Organization Journal* [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2025 May 24];16(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36816599/>
36. AR101 Oral Immunotherapy for Peanut Allergy. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2018 Nov 22 [cited 2025 May 24];379(21):1991–2001. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30449234/>

37. Chinthrajah RS, Purington N, Andorf S, Long A, O’Laughlin KL, Lyu SC, et al. Sustained outcomes in oral immunotherapy for peanut allergy (POISED study): a large, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *The Lancet* [Internet]. 2019 Oct 19 [cited 2025 May 24];394(10207):1437–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31522849/>
38. Chu DK, Wood RA, French S, Fiocchi A, Jordana M, Wasserman S, et al. Oral immunotherapy for peanut allergy (PACE): a systematic review and meta-analysis of efficacy and safety. *The Lancet* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2025 May 24];393(10187):2222–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31030987/>
39. Cook QS, Burks AW. Peptide and Recombinant Allergen Vaccines for Food Allergy. *Clin Rev Allergy Immunol* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2025 May 24];55(2):162–71. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12016-018-8673-4>
40. Prickett SR, Rolland JM, O’Hehir RE. Immunoregulatory T cell epitope peptides: the new frontier in allergy therapy. *Clinical and Experimental Allergy* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2025 May 24];45(6):1015. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4654246/>
41. Voskamp AL, Khosa S, Phan T, DeBerg HA, Bingham J, Hew M, et al. Phase 1 trial supports safety and mechanism of action of peptide immunotherapy for peanut allergy. *Allergy* [Internet]. 2024 Feb 1 [cited 2025 May 24];79(2):485–98. Available from: [/doi/pdf/10.1111/all.15966](https://doi/pdf/10.1111/all.15966)
42. Texier C, Hervé M, Pouvelle S, Ménez A, Maillère B. On the diversity and heterogeneity of H-2(d)-restricted determinants and T cell epitopes from the major bee venom allergen. *Int Immunol* [Internet]. 1999 [cited 2025 May 24];11(8):1313–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10421789/>
43. Ballmer-Weber BK, Brockow K, Fiocchi A, Theler B, Vogel L, Ring J, et al. Hydrolysed egg displays strong decrease in allergenicity and is well tolerated by egg-allergic patients. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2025 May 25];71(5):728–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26836363/>
44. Lozano-Ojalvo D, López-Fandiño R. Immunomodulating peptides for food allergy prevention and treatment. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2018 Jul 3 [cited 2025

- Jun 17];58(10):1629–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28102702/>
45. López-Fandiño R, Molina E, Lozano-Ojalvo D. Intestinal factors promoting the development of ROR γ t⁺ cells and oral tolerance. *Front Immunol*. 2023 Oct 23;14:1294292.
 46. Martínez-Blanco M, Pérez-Rodríguez L, Lozano-Ojalvo D, Molina E, López-Fandiño R. Ovalbumin-derived peptides activate retinoic acid signalling pathways and induce regulatory responses through toll-like receptor interactions. *Nutrients* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2025 May 25];12(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32245005/>
 47. Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H. Oral tolerance. *Immunol Rev* [Internet]. 2011 May [cited 2025 May 25];241(1):241–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21488901/>
 48. Tordesillas L, Berin MC. Mechanisms of Oral Tolerance. *Clin Rev Allergy Immunol* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2025 May 25];55(2):107–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29488131/>
 49. Rigby NM, Marsh J, Sancho AI, Wellner K, Akkerdaas J, Van Ree R, et al. The purification and characterisation of allergenic hazelnut seed proteins. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2008 Nov [cited 2025 Jun 23];52(SUPPL. 2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19006093/>
 50. Lozano-Ojalvo D, Pérez-Rodríguez L, Pablos-Tanarro A, Molina E, López-Fandiño R. Hydrolysed ovalbumin offers more effective preventive and therapeutic protection against egg allergy than the intact protein. *Clinical and Experimental Allergy* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2025 Jun 23];47(10):1342–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28763132/>
 51. Tsukumo H, Matsunari N, Yamashita K, Kojima H, Itagaki H. Lipopolysaccharide interferes with the use of the human Cell Line Activation Test to determine the allergic potential of proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2025 Jun 23];92:34–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29438744/>
 52. Benedé S, Pérez-Rodríguez L, Martínez-Blanco M, Molina E, López-Fandiño R. Oral Exposure to House Dust Mite Activates Intestinal Innate Immunity. *Foods* 2021, Vol 10, Page 561 [Internet]. 2021 Mar 9 [cited 2025 Jun 23];10(3):561.

- Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/3/561/htm>
53. Lozano-Ojalvo D, Molina E, López-Fandiño R. Regulation of Exacerbated Immune Responses in Human Peripheral Blood Cells by Hydrolysed Egg White Proteins. *PLoS One* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2025 Jun 22];11(3):e0151813. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0151813>
 54. Musa I, Ardalani F, Yang N, Maleki SJ, Li XM. Murine model of cross-IgE sensitization and cross-anaphylactic reactions among multiple group food allergens. *Front Immunol*. 2024 Jan 7;15:1497368.
 55. Lozano-Ojalvo D, Pérez-Rodríguez L, Pablos-Tanarro A, Molina E, López-Fandiño R. Hydrolysed ovalbumin offers more effective preventive and therapeutic protection against egg allergy than the intact protein. *Clinical and Experimental Allergy* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2025 Jun 18];47(10):1342–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28763132/>
 56. Nugraha R, Ruethers T, Johnston EB, Rolland JM, O’hehir RE, Kamath SD, et al. Effects of Extraction Buffer on the Solubility and Immunoreactivity of the Pacific Oyster Allergens. *Foods* 2021, Vol 10, Page 409 [Internet]. 2021 Feb 12 [cited 2025 Jun 17];10(2):409. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/2/409/htm>
 57. L’Hocine L, Pitre M. Quantitative and qualitative optimization of allergen extraction from peanut and selected tree nuts. Part 2. Optimization of buffer and ionic strength using a full factorial experimental design. *Food Chem* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2025 Jun 23];194:820–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26471623/>
 58. Zayas JF. *Functionality of Proteins in Food*. Functionality of Proteins in Food. 1997;
 59. Singh H, Cantoria MJ, Malave P, Saputra D, Maleki S. Standardization of RP-HPLC methods for the detection of the Standardization of RP-HPLC methods for the detection of the major peanut allergens Ara h 1, Ara h 2 and Ara h 3 major peanut allergens Ara h 1, Ara h 2 and Ara h 3. [cited 2025 Jun 17]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.024>
 60. Haidar E, Lakkis J, Karam M, Koubaa M, Louka N, Debs E. Peanut Allergenicity: An Insight into Its Mitigation Using Thermomechanical Processing. *Foods*

- [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2025 Jun 26];12(6):1253. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10048206/>
61. Maleki SJ, Kopper RA, Shin DS, Park CW, Compadre CM, Sampson H, et al. Structure of the Major Peanut Allergen Ara h 1 May Protect IgE-Binding Epitopes from Degradation. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2000 Jun 1 [cited 2025 Jun 26];164(11):5844–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10820263/>
 62. Mueller GA, Maleki SJ, Pedersen LC. The Molecular Basis of Peanut Allergy. *Curr Allergy Asthma Rep* [Internet]. 2014 May 1 [cited 2025 Jun 26];14(5):429. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4785306/>
 63. Pitre M, L'hocine L, Achouri A, Blaqui re M, Roches A Des. Immunoglobulin e-binding pattern of canadian peanut allergic children and cross-reactivity with almond, hazelnut and pistachio. *Biomolecules* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2025 Jun 17];10(8):1–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32707944/>
 64. Tjendana Tjhin V, Oda M, Yamashita M, Iwaki T, Fujita Y, Wakame K, et al. Baseline data collections of lipopolysaccharide content in 414 herbal extracts and its role in innate immune activation. *Sci Rep* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2025 Jun 26];14(1):1–18. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-66081-2>
 65. Ivanusic D, Denner J. Sensitive detection of lipopolysaccharides by monitoring of interleukin-10 secretion from human PBMCs. *MicroPubl Biol* [Internet]. 2023 [cited 2025 Jun 23];2023:10.17912/micropub.biology.000773. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10357324/>
 66. Commey L, Tengey TK, Cobos CJ, Dampanaboina L, Dhillon KK, Pandey MK, et al. Peanut seed coat acts as a physical and biochemical barrier against aspergillus flavus infection. *Journal of Fungi* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2025 Jun 23];7(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34946983/>
 67. Procedure for Endotoxin Removal from a Solution. 2011 [cited 2025 Jun 26]; Available from: www.thermoscientific.com/pierce
 68. Mant CT, Chen Y, Yan Z, Popa T V., Kovacs JM, Mills JB, et al. HPLC Analysis and Purification of Peptides. *Peptide Characterization and Application Protocols* [Internet]. 2007 [cited 2025 Jun 29];386:3. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7119934/>

69. Arribas C, Sanchiz A, Pedrosa MM, Perez-Garcia S, Linacero R, Cuadrado C. Impact of Heat and Pressure Processing Treatments on the Digestibility of Peanut, Hazelnut, Pistachio and Cashew Allergens. *Foods* [Internet]. 2024 Nov 1 [cited 2025 Jun 29];13(22):3549. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/13/22/3549/htm>
70. Shu E, Wang S, Niu B, Chen Q. Effect of Peanut Protein Treated with Alkaline Protease and Flavorzyme on BALB/c Mice. *Foods* [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2025 Jun 29];12(13):2634. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/13/2634/htm>
71. Foo ACY, Mueller GA. Abundance and Stability as Common Properties of Allergens. *Frontiers in Allergy* [Internet]. 2021 Oct 28 [cited 2025 Jun 17];2:769728. Available from: www.frontiersin.org
72. Tripet B, Cepeniene D, Kovacs JM, Mant CT, Krokhin O V., Hodges RS. Requirements for prediction of peptide retention time in reversed-phase high-performance liquid chromatography: Hydrophilicity/hydrophobicity of side-chains at the N- and C-termini of peptides are dramatically affected by the end-groups and location. *J Chromatogr A* [Internet]. 2007 Feb 9 [cited 2025 Jun 22];1141(2):212–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17187811/>
73. Wang R, Edrington TC, Storrs SB, Crowley KS, Ward JM, Lee TC, et al. Analyzing pepsin degradation assay conditions used for allergenicity assessments to ensure that pepsin susceptible and pepsin resistant dietary proteins are distinguishable. *PLoS One* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2025 Jun 22];12(2):e0171926. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5312868/>
74. Stanforth KJ, Wilcox MD, Chater PI, Brownlee IA, Zakhour MI, Banecki KMRM, et al. Pepsin properties, structure, and its accurate measurement: a narrative review. *Annals of Esophagus* [Internet]. 2022 Sep 25 [cited 2025 Jun 22];5(0). Available from: <https://aoe.amegroups.org/article/view/6128/html>
75. Hazebrouck S, Guillon B, Drumare MF, Paty E, Wal JM, Bernard H. Trypsin resistance of the major peanut allergen Ara h 6 and allergenicity of the digestion products are abolished after selective disruption of disulfide bonds. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2012 Apr 1 [cited 2025 Jun 29];56(4):548–57. Available from: [/doi/pdf/10.1002/mnfr.201100614](https://doi.org/10.1002/mnfr.201100614)

76. Gehrt F, Xu Q, Baiardini I, Canonica GW, Pfaar O. Adherence in allergen immunotherapy: Current situation and future implications. *Allergologie* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2025 Jun 27];45(12):876–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36457724/>
77. Lozano-Ojalvo D, Molina E, López-Fandiño R. Hypoallergenic hydrolysates of egg white proteins modulate allergen responses induced ex vivo on spleen cells from sensitized mice. *Food Research International* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2025 May 25];89(Pt 1):661–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28460964/>
78. Lozano-Ojalvo D, Martínez-Blanco M, Pérez-Rodríguez L, Molina E, López-Fandiño R. Oral Immunotherapy with Egg Peptides Induces Innate and Adaptive Tolerogenic Responses. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2025 Jun 26];63(17):1900144. Available from: [/doi/pdf/10.1002/mnfr.201900144](https://doi.org/10.1002/mnfr.201900144)

ANEXOS

ANEXO I. Alérgenos mayoritarios de cacahuete recogidos por la OMS/IUIS, su nomenclatura, peso molecular aproximado (MW), función biológica y principales características.

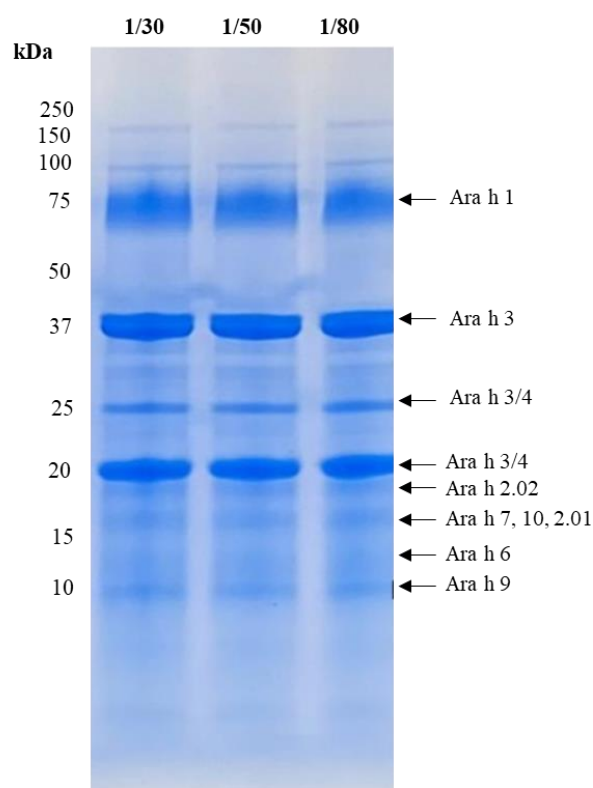
Alérgeno	MW	Función	Descripción
Ara h 1	69 kDa	7S globulina (vicilina)	Junto con h2 y h3, son los principales causantes de reacciones alérgicas en USA. Estructura estable (homotrímero unido por enlaces disulfuro) y actividad inhibitoria de tripsina (más resistente a la degradación proteolítica). Presenta dos isoformas, diferencia de 3 kDa. Resistente al calor y estable a la digestión.
Ara h2	16,65 kDa	2S albúmina	Antígeno principal causante de la alergia al cacahuete. Gran predictor de alergia (junto con h 1 y h 6 al menos en pacientes Europeos). Cuenta con dos isoformas, que difieren en 1,3 kDa. Segunda isoforma más potente que la primera en términos de inmunogenicidad.
Ara h 3	81 kDa	11S globulina (legumina)	Junto con Ara h 1, ambos se encuentran en pacientes que están sensibilizados ya con Ara h 2 (se explica por la alta homología en sitios de unión a IgE) Se ven distintas bandas en SDS-PAGE por su escisión en subunidad ácida (43 kDa) y básica (28 kDa)
Ara h 4	60 kDa	11S globulina	Isoforma de h 3

		(legumina)	
Ara h 5	15 kDa	Profilina	Relacionado con la sensibilización al polen por su gran homología con Phl p 12 y Bet v 2
Ara h 6	14,5 kDa	2S albúmina (conglutina)	Reacción cruzada con Ara h 2 por elevada homología estructural y fisicoquímica
Ara h 7	16,32 kDa	2S albúmina (conglutina)	Se requieren más estudios para determinar su prevalencia e implicación en la alergia al cacahuete. Reactividad cruzada con Ara h 2 y 6 por homología en propiedades FQ y por contar con un 53% de homología de secuencia primaria (35% terciaria)
Ara h 8	16,9 kDa	Proteína PR-10 y homólogo de Bet v 1	Presenta gran homología con Bet v 1 (alérgeno principal del polen). No es muy abundante.
Ara h 9	9,13 kDa	<i>Lipid transfer protein</i> (LTP) tipo I	Su sensibilización puede deberse al consumo de melocotón (proteína Pru P3). Muy prevalente en población europea, poca relevancia clínica. No presenta reacciones clásicas de IgE.
Ara h 10	16 kDa	Oleosina	Junto con Ara h 11, presentan una estructura muy hidrofóbica, dificultando su extracción y purificación. No obstante, ambas se consideran alérgenos menores
Ara h 11	14 kDa	Oleosina	-

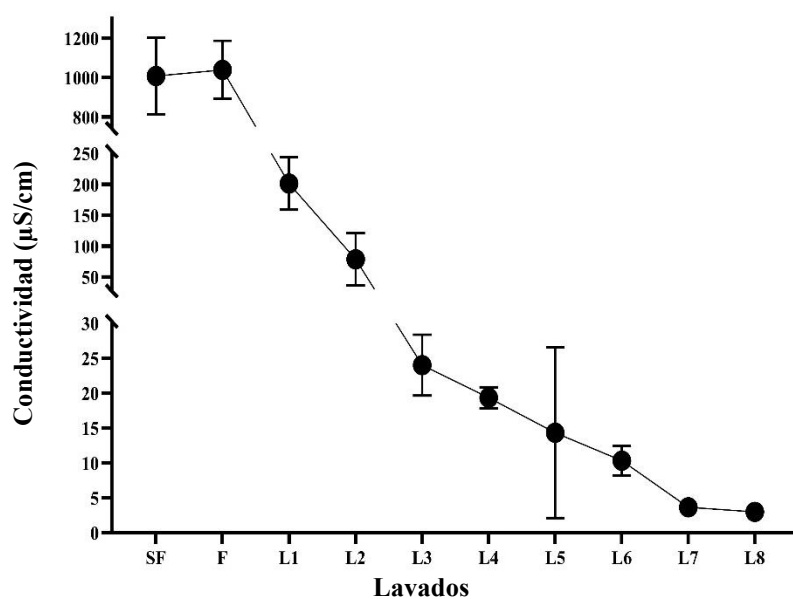
Ara h 12	5,2 kDa	Defensina (antifúngico)	Junto con Ara h 13, se requieren mas estudios para su caracterización, pero son causantes de consecuencias clínicas graves en la alergia al cacahuete
Ara h 13	5,5 kDa	Defensina	-
Ara h 14	18,4 kDa	Oleosina	Actualmente, la información disponible para Ara h 14 y 15 es limitada. Las evidencias sobre su estructura, función y relevancia clínica aún son insuficientes.
Ara h 15	17 kDa	Oleosina	-

ANEXO II. Anticuerpos utilizados en el marcaje extracelular e intracelular de los cultivos celulares de ratones sensibilizados al pistacho para su análisis mediante citometría de flujo espectral.

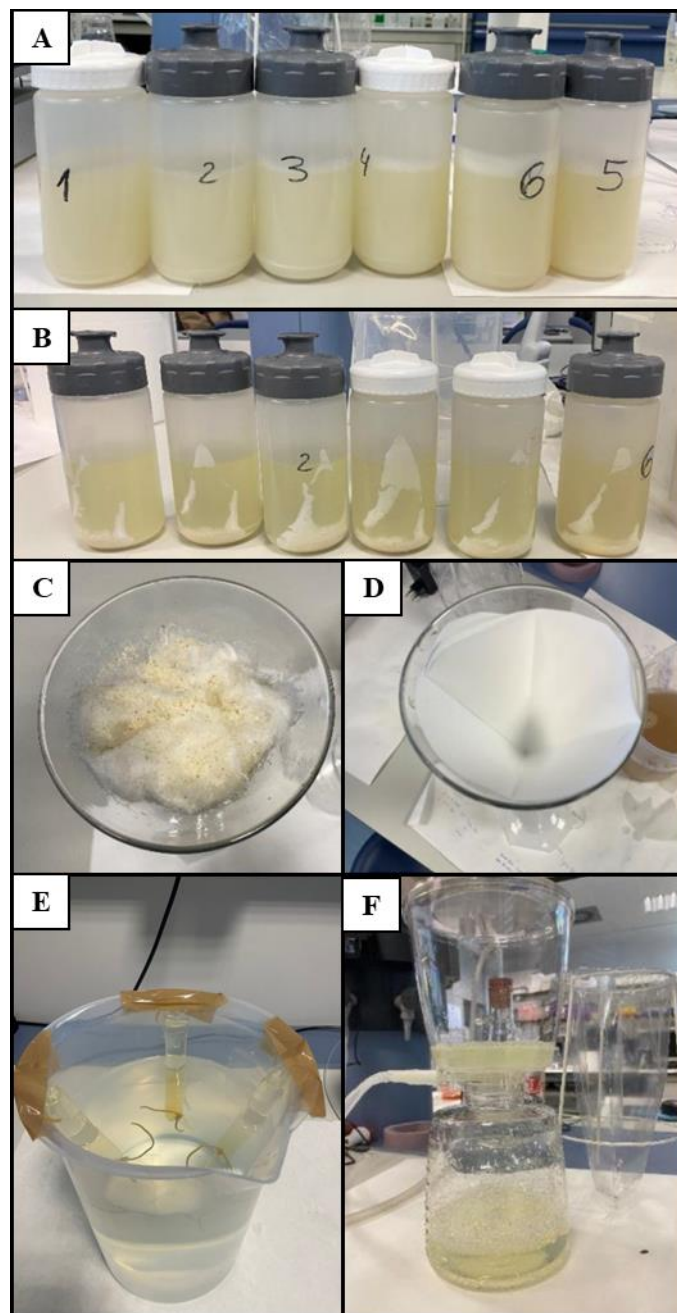
Fluoróforo	Marcador	Clon	Referencia	Compañía
BV 421	CCR4	2G12	131218	BioLegend
SB 436	CD11b	M1/70	62-0112-82	Thermo Fisher Scientific
PB	CD69	H1.2F3	104524	BioLegend
BV 510	CD86	GL-1	105040	BioLegend
BV 570	CD3	17A2	100225	BioLegend
BV 605	MHC-II	M5/114.15.2	107639	BioLegend
BV 650	CCR6	140706	140706	BD Biosciences
BV 711	CD25	PC61	107639	BioLegend
BV 785	CD62L	MEL-14	104440	BioLegend
BB 515	CD4	GK1.5	100494	BioLegend
PE	CXCR3	CXCR3-173	126506	BioLegend
PE-Dazzle 594	CD11c	N418	117348	BioLegend
PE-Fire 640	Ly6G	1A8	127676	BioLegend
PerCP	CD8a	53-6.7	100732	BioLegend
PerCP-eFluor 710	ST2	RMST2-2	46-9335-82	Thermo Fisher Scientific
PE-Cy7	OX40L	RM134L	108814	BioLegend
APC	GATA3	16E10A23	653806	BioLegend
AF 647	Foxp3	150D	320014	BioLegend
APC-Fire 750	CD80	16-10A1	104740	BioLegend
APC-Fire 810	Ly6C	HK1.4	128056	BioLegend



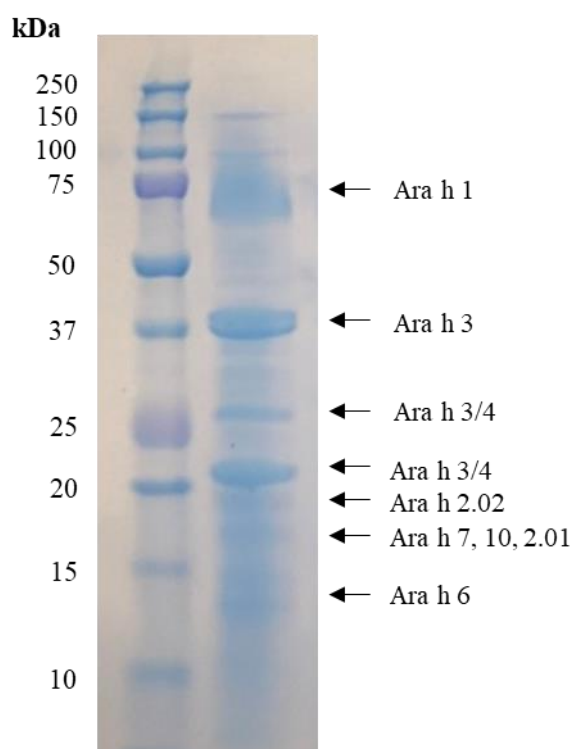
Anexo III. Análisis por SDS-PAGE de los extractos de cacahuete obtenidos a los ratios 1/30, 1/50 y 1/80 (p/v). En todos los casos, la harina de cacahuete se disolvió en tampón Tris-HCl 20 mM a pH 8,5. Se identifican las principales proteínas alergénicas del cacahuete (Ara h). MW: marcador de peso molecular.



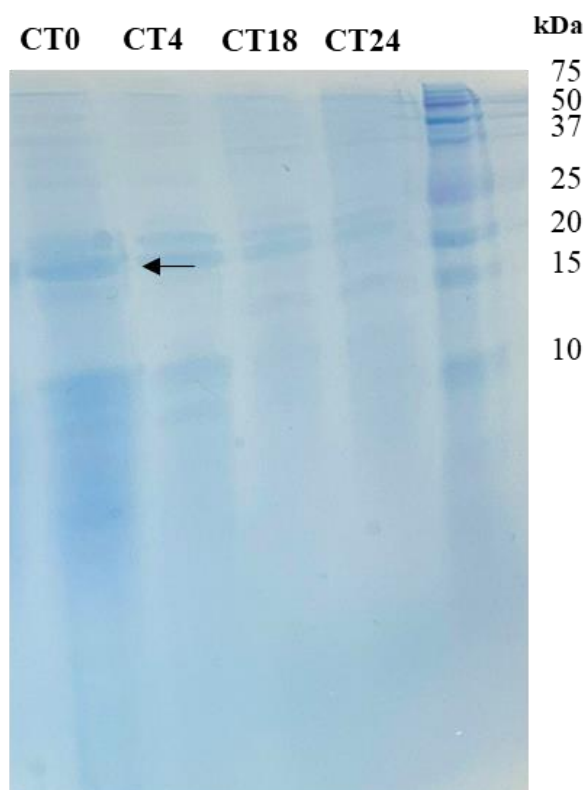
Anexo IV. Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) de las muestras a lo largo del proceso de diálisis. Evolución de la disminución de conductividad de los diferentes extractos durante el proceso de eliminación de sales con Amicon®Ultra. SF: extracto antes de los lavados; F: extracto filtrado por membrana Amicon® de 10 kDa; L1-L8: extracto tras cada uno de los lavados. Los datos se representan como la media $\pm$ desviación estándar de tres réplicas independientes para las condiciones SF-L5; dos réplicas independientes para L6 y sin réplicas en L7 y L8.



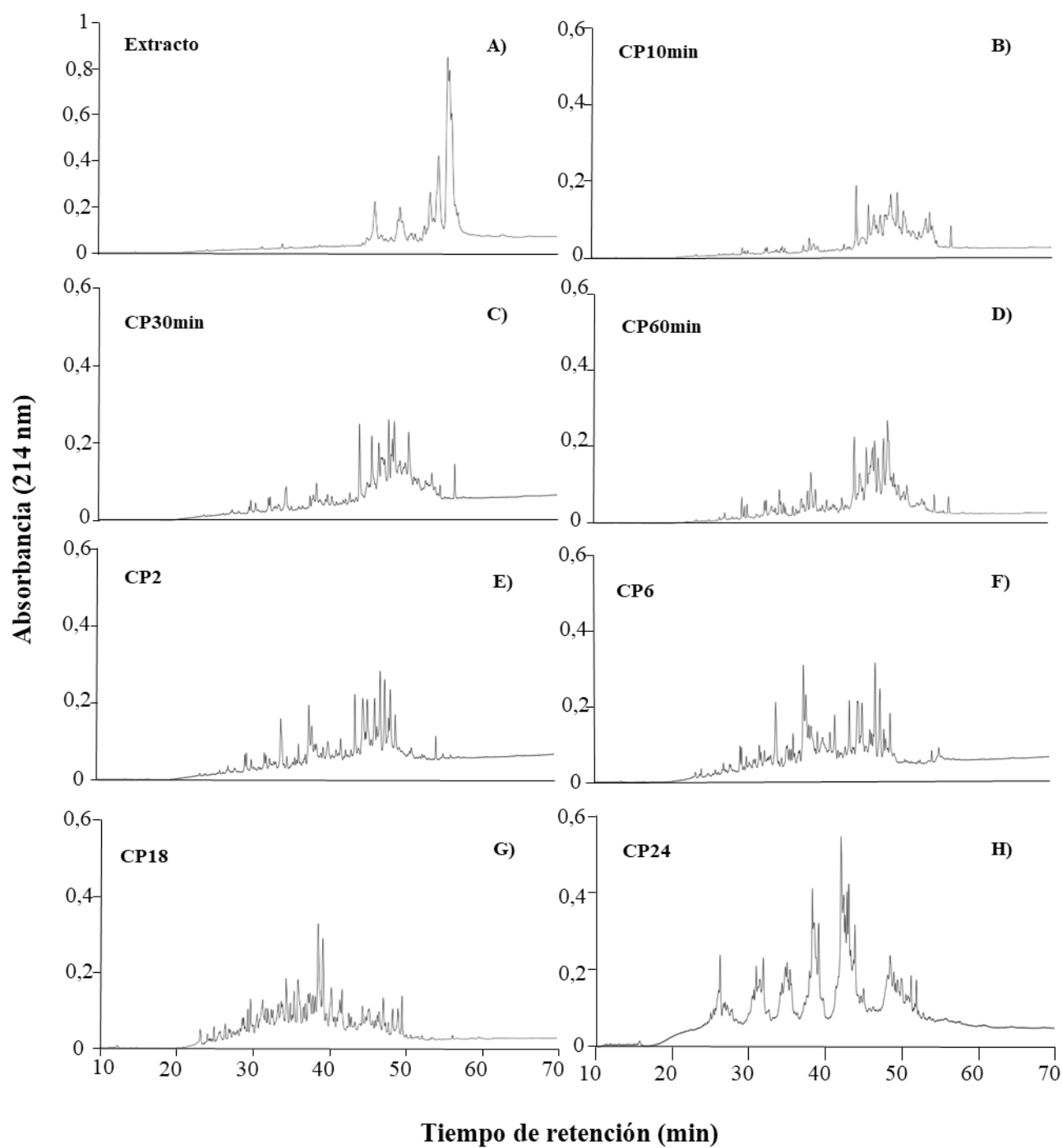
Anexo V. Etapas del proceso de extracción proteica de cacahuete a gran escala. A: Disolución de harina desgrasada de cacahuete en Tris-HCl 20 mM pH 8,5; B: Centrifugación a 16.000 x g durante 30 min; C: Filtración por lana de vidrio; D: Filtración por papel de filtro; E: Filtración por 0,45 μ m; F: Diálisis con membrana Spectra/Por® de 10 kDa.



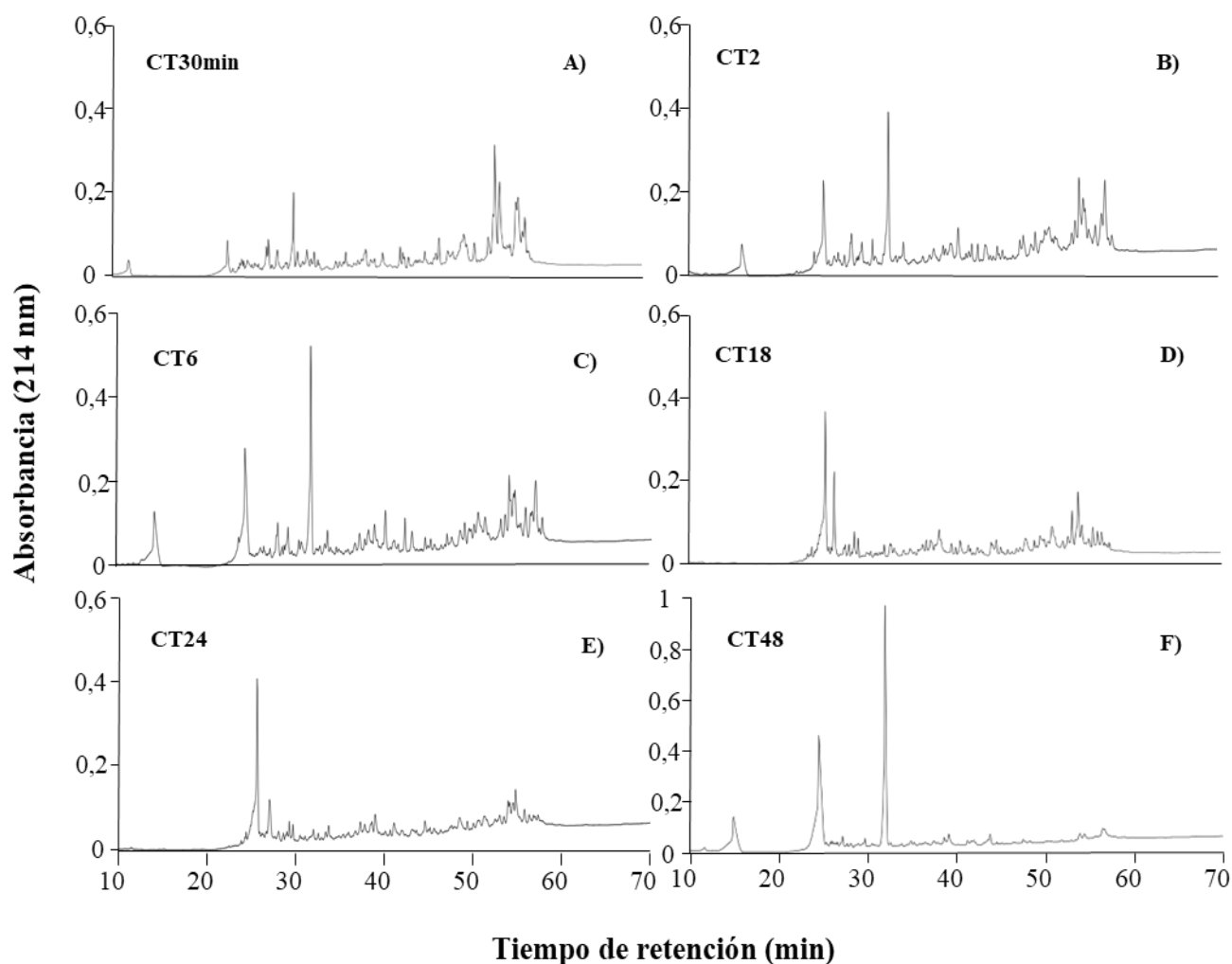
Anexo VI. Análisis por SDS-PAGE de los extractos de cacahuete disueltos en Tris-HCl pH 8,5 obtenidos a gran escala. Se identifican las principales proteínas alergénicas del cacahuete (Ara h). MW: marcador de peso molecular.



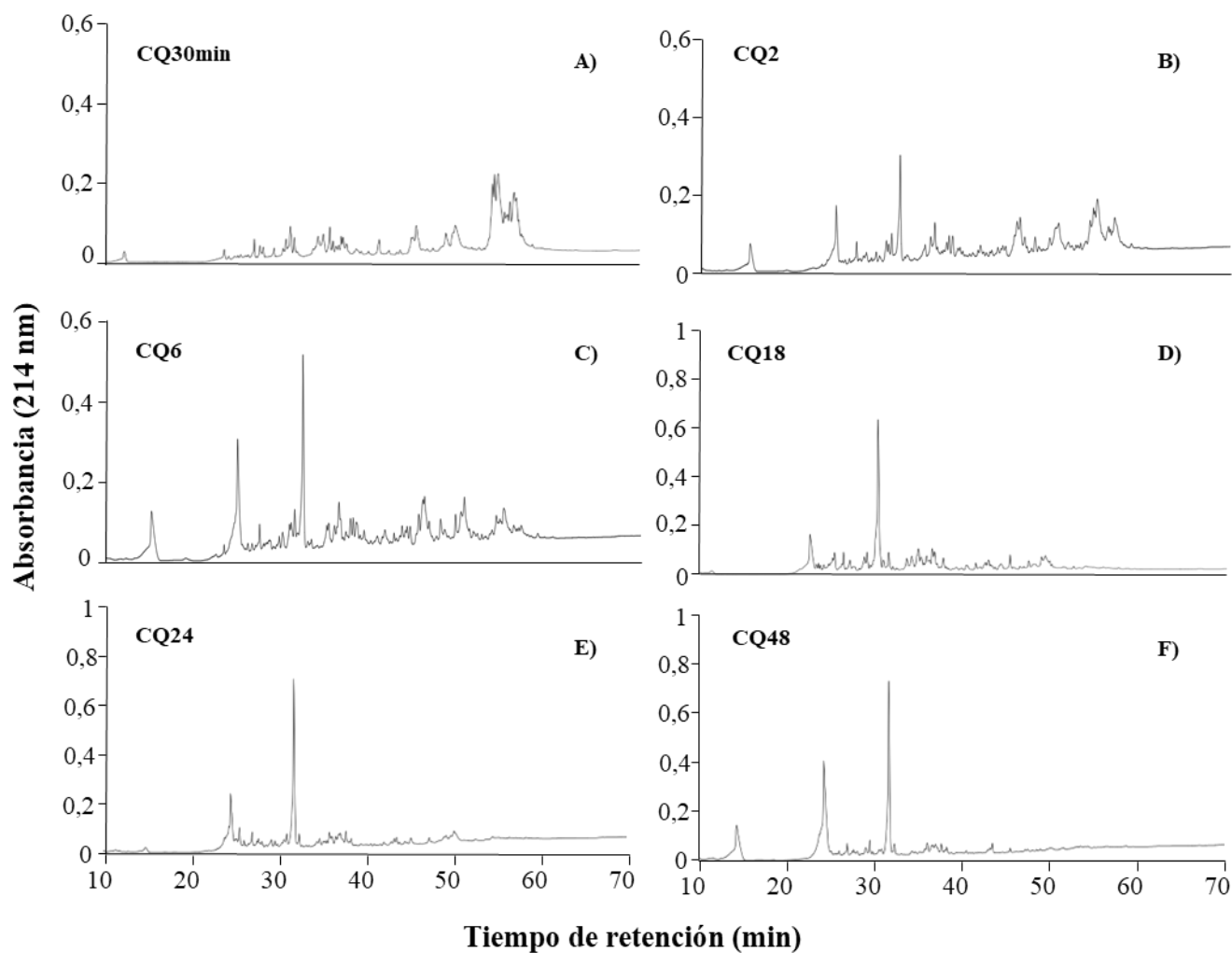
ANEXO VII. Electroforesis en gel de Tris-Tricina de hidrolizados de extracto de cacahuete a partir de harina desgrasada. Los hidrolizados mostrados son los generados con tripsina a tiempo 0, a las 4, 18 y 24 horas. La flecha indica la banda correspondiente a la tripsina, que cuenta con un peso molecular de 23,8 kDa. A medida que aumenta el tiempo de hidrólisis, los péptidos son más pequeños y la enzima se autohidroliza, produciendo una disminución de la intensidad de las bandas.



Anexo VIII: Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC de los hidrolizados de cacahuete tras digestión enzimática mediada por pepsina (CP). (A) Extracto de cacahuete sin hidrolizar, Extracto; (B) Pepsina 10 min, CP10min; (C) Pepsina 30 min, CP30min; (D) Pepsina 60 min, CP60min; (E) Pepsina 2h, CP2; (F) Pepsina 6h, CP6; (G) Pepsina 18h, CP18; (H) Pepsina 24h, CP24.



Anexo IX: Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC de los hidrolizados de cacahuete tras digestión enzimática mediada por tripsina (CT). (A) Tripsina 30 min, CT30min; (B) Tripsina 2h, CT2; (C) Tripsina 6h, CT6; (D) Tripsina 18h, CT18; (E) Tripsina 24h, CT24; (F) Tripsina 48h, CT48.



Anexo X: Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC de los hidrolizados de cacahuete tras digestión enzimática mediada por quimiotripsina (CQ). (A) Quimiotripsina 30 min, CQ30min; (B) Quimiotripsina 2h, CQ2; (C) Quimiotripsina 6h, CQ6; (D) Quimiotripsina 18h, CQ18; (E) Quimiotripsina 24h, CQ24; (F) Quimiotripsina 48h, CQ48.