

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biotecnología



**Universidad
Europea**

**CARACTERIZACIÓN DE LA
MODULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL
EPITELIO INTESTINAL HUMANO EN
RESPUESTA POR UN HIDROLIZADO DE
OVOALBÚMINA MEDIANTE RT-qPCR**

Laura Perdigón Fernández

Madrid, 2026

Autora: Laura Perdigón Fernández

CARACTERIZACIÓN DE LA MODULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL EPITELIO INTESTINAL HUMANO EN RESPUESTA POR UN HIDROLIZADO DE OVOALBÚMINA MEDIANTE RT-qPCR

Universidad Europea de Madrid
Facultad de Ciencias Biomédicas y de la Salud
Grado en Biotecnología



Tutor: Dr. Alejandro Barriga Torrejón

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Universidad Autónoma de Madrid

CIAL



UAM

**Directores: Dr. Daniel Lozano Ojalvo
Dra. Mónica Martínez Blanco**

Madrid, 2026

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Alergias alimentarias	1
1.2. Principales alérgenos del huevo	2
1.3. Mecanismos inmunológicos de la alergia alimentaria	2
1.3.1. <i>Mantenimiento de la tolerancia</i>	3
1.3.2. <i>Fase de sensibilización alérgica</i>	4
1.3.3. <i>Fase de elicitación</i>	5
1.4. Estrategias terapéuticas para el tratamiento de la alergia alimentaria	5
1.5. Aplicación de los hidrolizados para el tratamiento de la alergia al huevo	6
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	7
3. METODOLOGÍA	9
3.1. Selección y diseño de cebadores	9
3.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica	10
3.3. Cocultivos de células Caco-2 y células mononucleares de sangre periférica	11
3.4. Extracción de ácidos nucleicos y síntesis de DNA complementario	11
3.5. Condiciones de amplificación de los métodos de RT-qPCR	12
3.6. Determinación de la eficiencia de los métodos de RT-qPCR	12
3.7. Análisis de la expresión génica relativa de los genes diana mediante RT-qPCR	13
3.8. Análisis estadístico	14
3.9. Empleo de herramientas de inteligencia artificial	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
4.1. Selección y diseño de cebadores para estudiar la expresión por RT-qPCR	15
4.2. Validación de las condiciones de amplificación de los métodos de RT-qPCR	16
4.3. Evaluación del efecto inmunomodulador y tolerogénico de péptidos derivados de la ovoalbúmina hidrolizada con pepsina	21
4.4. Impacto sobre los Objetivos de Desarrollo Sostenible	25
5. CONCLUSIONES	26
6. BIBLIOGRAFÍA	27
ANEXOS	I-V

RESUMEN

Las alergias alimentarias han aumentado en las últimas décadas, convirtiéndose en un problema de salud pública relevante. Los tratamientos convencionales, basados en la evitación estricta, son complejos de seguir y la inmunoterapia oral tradicional presenta un riesgo elevado de reacciones adversas. Ante esto, los hidrolizados proteicos surgen como alternativas hipoalergénicas eficaces al carecer de epítomos alérgicos intactos y poseer péptidos con propiedades inmunomodulantes. Estudios previos demuestran que el hidrolizado de ovoalbúmina con pepsina (OP) es eficaz para el tratamiento de la alergia al huevo en modelos animales al interactuar con los receptores tipo Toll, promoviendo el metabolismo del ácido retinoico y la síntesis de la citocina reguladora TGF- β .

El objetivo de este trabajo es determinar el efecto de los péptidos de OP sobre la modulación de las respuestas proinflamatorias y tolerogénicas en células epiteliales del intestino humano mediante el estudio de su expresión génica con RT-qPCR. Para ello, se desarrollaron y validaron métodos para cuantificar genes diana como *PGE*, *GATA3*, *TSLP*, *IL33*, *TGFB1*, *TLR2* y *TLR4* en células Caco-2. Estas células se cocultivaron con células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) e incubadas con ovoalbúmina (OVA), OVA hidrolizada con pepsina, ácido retinoico (RA) y lipopolisacárido (LPS).

Los resultados indicaron que el OP reduce la expresión de las alarminas proalérgicas, como linfopoyetina estromal tímica (TSLP) e interleucinas (IL) IL-33, en las células Caco-2. Además, el hidrolizado aumentó la expresión de *TGFB1* y *TLR4*, marcadores cruciales para la inducción de tolerancia oral y el mantenimiento de la homeostasis intestinal. En conclusión, el trabajo confirma la capacidad de los péptidos de OP para inducir señales protolerogénicas, posicionando a este hidrolizado como un candidato para la inmunoterapia oral frente a la alergia al huevo.

PALABRAS CLAVE

Alergia alimentaria; RT-qPCR; Cebadores; Expresión génica; Ovoalbúmina; Hidrolizado; Caco-2; Citocinas inmunomoduladoras; Tolerancia oral; Inmunoterapia.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Alergias alimentarias

Las alergias alimentarias constituyen un grupo de enfermedades inmunomediadas en las que algunas proteínas habitualmente inocuas desencadenan respuestas inmunológicas patológicas en individuos previamente sensibilizados. Estas reacciones pueden abarcar un espectro clínico amplio, desde manifestaciones cutáneas o gastrointestinales leves hasta reacciones sistémicas graves como la anafilaxia potencialmente mortal (1).

En las últimas décadas, su prevalencia ha aumentado de forma significativa, situándose en torno al 8% en población pediátrica y aproximadamente al 10% en adultos en países industrializados (2), lo que las ha consolidado como un problema relevante de salud pública debido a su impacto clínico, social y en la calidad de vida de los pacientes (3,4). Este incremento se ha relacionado con múltiples factores interdependientes, incluyendo cambios en la exposición temprana a antígenos alimentarios, alteraciones de la microbiota intestinal y una disrupción de los mecanismos de tolerancia oral, lo que favorece la activación exacerbada del sistema inmunológico adaptativo (5,6).

Dentro de este conjunto de patologías, la alergia al huevo se sitúa entre las alergias alimentarias más frecuentes durante la infancia, con una prevalencia estimada del 0,8 % en niños pequeños, lo que pone de manifiesto su relevancia clínica (7). Aunque su prevalencia es inferior a la descrita para la alergia a las proteínas de la leche de vaca, considerada la alergia alimentaria más común en los primeros años de vida y cuya prevalencia se estima entre el 1 % y el 7,5 %, la alergia al huevo constituye una de las principales causas de alergia alimentaria en la población pediátrica (8). Además, su importancia clínica no se limita a su frecuencia, ya que diversos estudios han demostrado que los niños con alergia al huevo presentan un mayor riesgo de desarrollar otras enfermedades alérgicas. Entre ellas destacan la alergia a otros alimentos, como la leche de vaca o el cacahuete, así como la aparición de dermatitis atópica persistente y asma, formando parte de la denominada “marcha atópica”, un proceso caracterizado por la aparición secuencial de diferentes manifestaciones alérgicas a lo largo de la infancia. Por ello, la alergia al huevo se considera un posible marcador temprano de predisposición al desarrollo posterior de patologías atópicas (7).

1.2. Principales alérgenos del huevo

La alergia al huevo está mediada principalmente por inmunoglobulina E (IgE) dirigida contra proteínas de la clara, donde se concentran los principales alérgenos. Entre ellos destacan el ovomucoide (OM; Gal d 1, 11%), la ovoalbúmina (OVA; Gal d 2, 54%), la ovotransferrina (OVT; Gal d 3, 12%) y la lisozima (LYS; Gal d 4, 3,5%). A pesar de que la OVA constituye la fracción proteica predominante, el OM es el principal alérgeno desde el punto de vista clínico, lo que sugiere que la alergenidad no depende únicamente de la abundancia relativa (9).

Esta mayor relevancia del OM se debe a su elevada estabilidad estructural, derivada de su alto contenido en enlaces disulfuro, que le otorgan resistencia tanto a la desnaturalización térmica como a la digestión enzimática gastrointestinal. Como consecuencia, mantiene sus epítomos alérgicos tras el proceso digestivo, favoreciendo la consecuente respuesta alérgica. En contraste, proteínas más lábiles como la OVA, la OT y la LYS se desnaturalizan con mayor facilidad, lo que reduce su capacidad alérgica (9,10).

Por otro lado, también se han descrito alérgenos en la yema, como la seroalbúmina (Gal d 5) y la proteína YGP42 (Gal d 6), aunque su relevancia clínica aún no está completamente definida (11–13).

1.3. Mecanismos inmunológicos de la alergia alimentaria

La alergia alimentaria se define como una respuesta inmunológica adversa y exacerbada frente a proteínas alimentarias que son comúnmente inocuas para la población general. Este fenómeno clínico es el resultado de un fallo en el mecanismo de inducción de la tolerancia oral o de una ruptura de esta, lo que desencadena mecanismos de hipersensibilidad.

El proceso inmunológico comienza en la barrera intestinal, una estructura compleja compuesta por una monocapa de enterocitos, células caliciformes (*goblet*) productoras de moco y células M (con micropliegues) especializadas en la monitorización de la luz intestinal, todas ellas formando parte de las células epiteliales intestinales (IECs, *intestinal epithelial cells*). Los alérgenos pueden atravesar este epitelio mediante cuatro rutas principales: alterando las uniones estrechas (vía paracelular), por transcitosis a través de los enterocitos, mediante el transporte por células M hacia las placas de Peyer, o siendo capturados directamente por las células dendríticas (DCs) subepiteliares que extienden sus dendritas hacia el lumen.

1.3.1. Mantenimiento de la tolerancia

El mantenimiento de la tolerancia oral es un proceso inmunológico activo que permite al sistema inmunológico distinguir de forma constante entre antígenos alimentarios inocuos y señales de peligro, evitando así respuestas inflamatorias innecesarias. Este equilibrio depende de la interacción entre las células epiteliales y diferentes poblaciones mieloides y linfoides del tejido linfoide asociado al intestino (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*).

Las IECs no sólo actúan como barrera física, sino también como reguladoras del entorno inmunológico local. En condiciones basales secretan factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , *transforming growth factor beta*) y alarminas como la linfopoyetina estromal tímica (TSLP), la interleucina (IL) 25 (IL-25) y la IL-33, que en ausencia de daño tisular contribuyen al mantenimiento de la vigilancia inmunológica, la reparación tisular y la homeostasis de la barrera intestinal. Además, estas células participan en el metabolismo de la vitamina A mediante la expresión de la retinaldehído deshidrogenasa 1 (RALDH1; gen *Aldh1a1*), que permite la producción de ácido retinoico (RA, *retinoic acid*), una molécula clave en la inducción de la tolerancia. Este compuesto actúa como ligando de los receptores nucleares RAR/RXR, modulando la expresión génica de *RORC* y del eje IL22/IL22 binding protein (IL-22BP), lo que contribuye a la regulación de la respuesta inflamatoria y al mantenimiento de un entorno inmunológico tolerogénico. (14,15)

Las DCs CD103⁺ también son fundamentales en la inducción de tolerancia oral. Estas células capturan antígenos alimentarios y migran a los ganglios linfáticos mesentéricos de manera dependiente del receptor de quimiocinas CCR7, donde presentan los antígenos a linfocitos T colaboradores tipo 0 (Th0 *T helper 0*) en ausencia de señales inflamatorias. Estas células expresan la retinaldehído deshidrogenasa 2 (RALDH2; gen *Aldh1a2*), lo que les permite producir RA de forma autónoma. Junto con el TGF- β , este metabolito favorece la diferenciación de linfocitos T hacia células T reguladoras (Tregs) FoxP3⁺. Además, la expresión de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) e integrina $\alpha\beta$ 8 contribuye a reforzar la señalización por TGF- β y estabilizar el perfil antiinflamatorio.

Una vez generadas, estas células Tregs migran de vuelta a la mucosa intestinal impulsadas por la expresión de receptores de migración (*homing*) como la integrina α 4 β 7 y el receptor CCR9, inducidos por RA. En el tejido intestinal, las células Tregs ejercen su función

supresora principalmente mediante la producción de IL-10 y TGF- β , limitando la activación de células efectoras y manteniendo la homeostasis frente a los antígenos alimentarios y la microbiota comensal (16).

1.3.2. Fase de sensibilización alérgica

Como se ha descrito previamente, las IECs secretan alarminas como TSLP, IL-25 e IL-33 en condiciones de homeostasis. Sin embargo, ante la presencia de daño epitelial o el contacto con alérgenos, este sistema incrementa de manera significativa su secreción actuando ahora como señales de alerta inmunológica.

Estas moléculas condicionan la activación y el estado funcional de las DCs, promoviendo su polarización hacia un fenotipo proalérgico o de tipo 2. En este contexto, las DCs incrementan la expresión de moléculas coestimuladoras como OX40L y adquieren una capacidad aumentada para inducir respuestas de tipo 2. Posteriormente, estas DCs capturan y procesan el antígeno, migran a los ganglios linfáticos mesentéricos y presentan los péptidos antigénicos en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) a linfocitos Th0, proporcionando además las señales coestimuladoras necesarias para su activación y diferenciación.

En este entorno inflamatorio, los linfocitos Th0 se diferencian a linfocitos T colaboradores tipo 2 (Th2, *T helper 2*), gracias a un proceso regulado principalmente por la activación del factor de transcripción proteína de unión a *GATA 3* (*GATA3*, *GATA binding protein 3*) e influido por citocinas del microambiente, especialmente la IL-4. Las células Th2 orquestan la respuesta alérgica mediante la secreción de citocinas efectoras específicas. La IL-4 es la citocina clave para el cambio de clase en los linfocitos B, promoviendo la producción de IgE específica frente al alérgeno. Por su parte, la IL-5 favorece la diferenciación, proliferación y activación de eosinófilos, así como su reclutamiento al tejido inflamado. IL-13 actúa de forma sinérgica con la IL-4, potenciando la producción de IgE y contribuyendo a la inflamación tisular, la hipersecreción de moco y el remodelado epitelial.

Como consecuencia de esta respuesta, las IgE específicas producidas por los linfocitos B se unen con alta afinidad al receptor Fc ϵ RI expresado en la superficie de los mastocitos y basófilos, sensibilizando estas células y dejando al sistema inmunitario preparado para una respuesta inmediata ante futuras exposiciones al mismo alérgeno, en las que el

entrecruzamiento de IgE desencadena su activación y la liberación de mediadores inflamatorios.

1.3.3. Fase de elicitación

La fase de elicitación ocurre tras una reexposición al alérgeno. Al atravesar de nuevo la barrera epitelial, el antígeno provoca el entrecruzamiento de las IgE unidas a los mastocitos y basófilos, activando una cascada de señalización que culmina en su degranulación. Este proceso libera mediadores inflamatorios inmediatos como la histamina, los leucotrienos y las prostaglandinas (PGs), responsables de los síntomas clínicos. Además, los mastocitos activados liberan factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , *tumor necrosis factor alpha*) y quimiocinas de la familia C-C, que reclutan a otras células inmunológicas, amplificando la respuesta inflamatoria local.

1.4. Estrategias terapéuticas para el tratamiento de la alergia alimentaria

El manejo actual de la alergia alimentaria se basa principalmente en la evitación estricta del alimento implicado y en el tratamiento de las reacciones agudas tras exposiciones accidentales. Este enfoque, aunque eficaz en la prevención inmediata, no modifica el curso natural de la enfermedad ni induce tolerancia inmunológica sostenida. Además, la evitación completa resulta compleja en la práctica clínica debido a la ubicuidad de los alérgenos alimentarios y al riesgo de exposiciones involuntarias (17).

En los últimos años, la introducción temprana de alimentos alergénicos ha emergido como una estrategia preventiva eficaz. Varios ensayos clínicos han demostrado que la exposición precoz a alimentos durante ventanas críticas del desarrollo inmunitario reduce el riesgo de sensibilización y de alergia posterior, en relación con la inducción de mecanismos de tolerancia oral dependientes de la maduración del sistema inmunitario intestinal (18). Aunque desde el punto de vista farmacológico, los anticuerpos monoclonales anti-IgE como omalizumab han mostrado eficacia en la reducción de la reactividad clínica, incrementando el umbral de respuesta y disminuyendo la gravedad de las reacciones, su efecto es dependiente del tratamiento continuado y no inducen tolerancia inmunológica duradera (19,20).

Por otra parte, la inmunoterapia con alérgenos (AIT, *allergen immunotherapy*), y especialmente la inmunoterapia oral (OIT, *oral immunotherapy*), constituyen la estrategia más eficaz para inducir desensibilización en alergia alimentaria mediada por IgE. No

obstante, su uso clínico está limitado por la frecuencia de reacciones adversas durante la escalada y la necesidad de un mantenimiento prolongado para preservar el efecto (21).

En este contexto, los alérgenos modificados e hidrolizados proteicos han surgido como alternativas con un mejor perfil de seguridad, capaces de derivar potencialmente hacia perfiles menos inflamatorios y más tolerogénico (22,23).

1.5. Aplicación de los hidrolizados para el tratamiento de la alergia al huevo

La inmunoterapia específica con alérgenos representa una de las estrategias más prometedoras en el tratamiento de la alergia alimentaria mediada por IgE. Sin embargo, su aplicación clínica se ve limitada por la frecuencia de efectos adversos y la necesidad de tratamientos prolongados, lo que ha impulsado el desarrollo de aproximaciones basadas en alérgenos modificados.

En este contexto, el hidrolizado de OVA con pepsina (OP) destaca como una alternativa hipoalergénica con capacidad inmunomoduladora. En modelos murinos BALB/c, el OP no induce sensibilización ni reactividad alérgica sistémica, ya que no induce producción de IgE, IgG1 o IgA específicas ni desencadena signos de anafilaxia tras el desafío antigénico, confirmando así incapacidad para activar mastocitos sensibilizados. Además de mostrar un mejor perfil de seguridad, el OP muestra mayor eficacia que la proteína nativa en la prevención del desarrollo de la alergia, ya que ambos inducen tolerancia, pero sólo el OP produce una protección completa sin riesgo de anafilaxia.

A nivel mecanicista, los péptidos derivados del OP interactúan con los receptores tipo Toll 2 y 4 (TLR2/4, *Toll-like receptors*), activando vías asociadas al metabolismo de la vitamina A. Como consecuencia, aumenta la expresión de las enzimas RALDH1 en las células epiteliales intestinales y RALDH2 en DCs, favoreciendo la producción de RA. Este actúa junto con el TGF- β para suprimir señales proalérgicas (IL-33, TSLP) y promover citocinas reguladoras como la IL-10. Este entorno favorece la expansión de linfocitos T reguladores FoxP3⁺ROR γ t⁺, altamente estables y con potente capacidad supresora de respuestas de tipo 2, contribuyendo al establecimiento de un estado de tolerancia inmunológica sostenida.

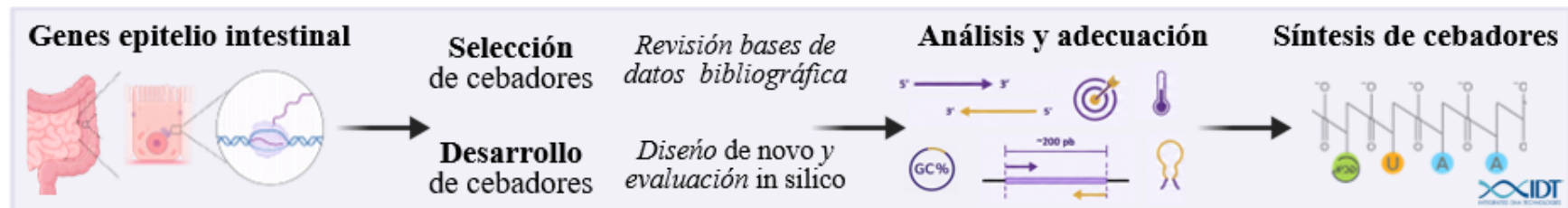
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo principal de este trabajo consiste en determinar los mecanismos tolerogénicos promovidos en las células del epitelio intestinal por un hidrolizado de ovoalbúmina con pepsina con propiedades inmunomodulantes y antialérgicas. Para alcanzar este objetivo global, se han establecido dos objetivos específicos:

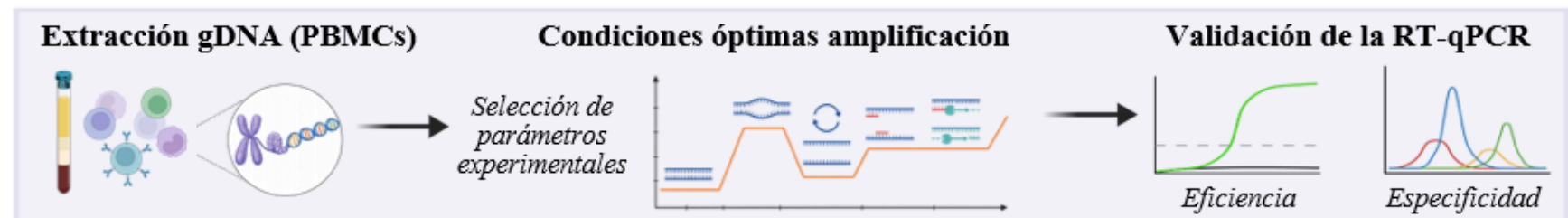
1. Desarrollar y validar ensayos de RT-qPCR específicos y eficientes para la cuantificación de la expresión de genes asociados a respuestas proinflamatorias de tipo alérgico (*GATA3*, *IL13*, *IL25*, *IL33*, *JAG2*, *PGE* y *TSLP*) y a mecanismos reguladores de la tolerancia oral (*ALDH1A1*, *ALDH1A2*, *IL10*, *TGFB1*, *TLR2* y *TLR4*) en células epiteliales humanas.
2. Caracterizar el efecto de los péptidos presentes en un hidrolizado de ovoalbúmina con pepsina (OP) sobre la modulación de respuestas asociadas a la sensibilización alérgica y a la inducción de tolerancia inmunológica intestinal a proteínas alimentarias en células epiteliales humanas mediante el análisis de su expresión génica basado en el empleo de los ensayos de RT-qPCR previamente optimizados.

La Figura 1 recoge el plan de diseñado para este trabajo basado en tres etapas principales:

1. Selección y diseño de cebadores de RT-qPCR para genes de interés en el epitelio intestinal



2. Determinación y validación de métodos de RT-qPCR para la expresión de genes epiteliales



3. Evaluación del efecto de péptidos tolerogénicos en la expresión génica de células intestinales



Figura 1. Esquema del plan de trabajo. RT-qPCR, *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*; cDNA, *complementary DNA*; gDNA, *genomic DNA*; PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*; LPS, *lipopolysaccharide*; OVA, *ovoalbúmina*; RA, *retinoic acid*; OP, *OVA hidrolizada*.

3. METODOLOGÍA

3.1. Selección y diseño de cebadores

Los genes objeto de estudio mediante los ensayos RT-qPCR fueron *ALDH1A1*, *ALDH1A2*, *IL10*, *IL13*, *IL25*, *IL33*, *GATA3*, *JAG2*, *PGE*, *TGFB1*, *TLR2*, *TLR4*, *TSLP* y *GAPDH*, siendo este último el control endógeno de expresión constitutiva utilizado como gen de referencia para el estudio de la expresión génica.

Debido a la amplia disponibilidad de cebadores descritos en la bibliografía para el estudio de la expresión génica de estos genes humanos, se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva en las bases de datos Web of Science (Clarivate, London, Reino Unido), PubMed (NCBI, Bethesda, EE. UU) y RTPrimerDB (Ghent University, Ghent, Bélgica). Como criterios de búsqueda se emplearon los términos: *gene expression*, *RT-qPCR*, *egg allergy*, *intestinal epithelial cells*, *Caco-2*, *human PBMCs*, *gut cells*, *mucosal immunology* y el nombre del gen de interés.

La adecuación de los cebadores identificados se evaluó *in silico* mediante las herramientas bioinformáticas Primer-BLAST (NCBI, Bethesda, EE. UU), PRIMER 3 Plus (Wageningen University, Wageningen, Países Bajos) y Primer Quest (Integrated DNA Technologies, Coralville, EE. UU), con el fin de seleccionar parejas de candidatos que se adecuasen a los criterios de idoneidad recomendados para ensayos de RT-qPCR (24) (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades de cebadores para su empleo en RT-qPCR. Criterios técnicos para el diseño de cebadores para RT-qPCR basadas en la metodología SYBR Green (adaptado de Bustin y col., 2025).

Característica del cebador	Criterio técnico
Contenido guanina/citosina	35-55% (óptimo 50%)
Temperatura <i>melting</i> (T _m)	58-65°C (< 3°C diferencia entre cebadores)
Longitud de la secuencia	15-24 pb ¹
Producto de amplificación	75-150 pb (óptima 80 pb)
Formación de estructuras	Evitar que forme dímeros y/o horquillas
Estabilidad del extremo 3'	≤ dos guaninas y/o citosina en últimas 5 pb
Estabilidad del extremo 5'	No terminar en guanina
Degeneración de las bases	Evitar en cualquier grado
Localización en el gen	Distintos exones de secuencias conservadas

¹pb, pares de bases.

En el caso de los genes *JAG2*, *ALDH1A1* y *ALDH1A2*, la disponibilidad de cebadores descritos para el estudio de su expresión en células del epitelio intestinal humano fue limitada, encontrándose una mayor disponibilidad de opciones destinadas al estudio en DCs. Además, de entre las alternativas identificadas en la literatura, un número elevado de ellas no cumplieron con los criterios de calidad especificados en la Tabla 1. Por ello, se optó por realizar un diseño *de novo* de los cebadores para *JAG2*, *ALDH1A1* y *ALDH1A2*, empleando los programas PRIMER 3 Plus (Wageningen University), UCSC Genome Browser (University of California, Santa Cruz, Santa Cruz, EE. UU.), Primer Quest (Integrated DNA Technologies) y Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, EE. UU.) utilizando como referencia las secuencias consenso de estos genes en humano (*Homo sapiens*). Las secuencias de referencia están disponibles en la base de datos GenBank (NIH, NCBI, EE. UU). Posteriormente se realizó una validación *in silico* y una alineación de las secuencias nucleotídicas mediante el empleo de las herramientas bioinformáticas Primer-BLAST (NCBI), Clustal-Omega (EMBL-EBI, Hinxton, Reino Unido) y UCSC Genome Browser (University of California, Santa Cruz, EE. UU). Finalmente, todas las parejas de cebadores seleccionadas o diseñadas para este trabajo fueron sintetizadas por IDT (Integrated DNA Technologies Inc, Leuven, Bélgica). y suministrados a una concentración de 100 μ M.

3.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Las muestras de sangre periférica se recolectaron de individuos no alérgicos, empleando tubos con heparina como anticoagulante. El aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) se llevó a cabo mediante centrifugación en gradiente de densidad, basada en la separación diferencial de poblaciones celulares en función de su densidad. En particular, la sangre total fue cuidadosamente estratificada sobre Ficoll-Histopaque (GE Healthcare, Chicago, EE. UU) y centrifugada a $1.500 \times g$ durante 20 minutos a temperatura ambiente, sin freno, permitiendo la formación de una interfase definida entre el plasma y la fase de gradiente. Las PBMCs fueron recuperadas de dicha interfase y sometidas a lavados sucesivos para eliminar plaquetas y restos de Ficoll. Finalmente, las PBMCs aisladas se utilizaron para la extracción de DNA genómico (gDNA, *genomic deoxyribonucleic acid*).

3.3. Cocultivos de células Caco-2 y células mononucleares de sangre periférica

Se estableció un sistema de cocultivo en insertos *Transwell* de policarbonato de 12 mm con poro de 0,4 μm en placas de 48 pocillos (Corning, Nueva York, EE. UU). Las células Caco-2 (ECACC 86010202; Teagasc, Irlanda) se sembraron en el compartimento apical (0,5 mL) a una densidad de $2,2 \times 10^5$ células/mL en el *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado con 20% (v/v) de suero fetal bovino (SFB), 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin y 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B (todo de Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU) y se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo (37°C, 5% CO₂ y atmósfera humidificada) hasta la formación de una monocapa epitelial diferenciada tras 21 días.

Durante la diferenciación, ambos compartimentos se mantuvieron con el medio de cultivo descrito para las Caco-2. Una vez establecida la monocapa, el compartimento basolateral se sustituyó por *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI 1640) suplementado con 10% (v/v) de SFB, 1% de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin. Los PBMCs se añadieron a una concentración de 10^6 células/mL. Los cocultivos se incubaron durante 24 horas en presencia de lipopolisacárido (LPS, *lipopolysaccharide*; 10 ng/mL), RA (30 mg/mL), OVA (200 mg/mL), OP (20 y 200 mg/mL) y exclusivamente con el medio como control negativo del experimento (CTRL). Tras el cultivo, se recogieron las células Caco-2, se preservaron en medio RA1 del kit NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel, Bethlehem, EE. UU) y mantuvieron a -80°C hasta su uso

3.4. Extracción de ácidos nucleicos y síntesis de DNA complementario

El gDNA se obtuvo a partir de PBMCs aisladas de sangre periférica de individuos sanos. La extracción se realizó utilizando el kit EZNA Tissue DNA Kit (Omega Bio-tek, Norcross, EE. UU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su utilización. La concentración del gDNA obtenido se determinó mediante espectrofotometría ultravioleta (UV) utilizando el NanoDrop 3300 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU). Además, se evaluó la pureza mediante los cocientes A₂₆₀/280 (A_{260/280}) y A₂₆₀/230 (A_{260/230}). Para el gDNA, se consideraron óptimos valores de A_{260/280} de 1,8-2,0 y A_{260/230} de 2,0-2,2 (25).

Para extraer el RNA de las células Caco-2 se empleó el kit NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel), siguiendo las especificaciones del fabricante. Durante todo el procedimiento, las

muestras se mantuvieron a 4 °C y el ARN se eluyó en 40 µL de agua libre de nucleasas. La concentración y pureza del RNA obtenido se determinaron en un NanoDrop 3300 (Thermo Fisher Scientific). Se consideraron óptimos valores de A_{260/280} cercanos a 2,0 y A_{260/230} de 2,0-2,2 (26,27).

Las muestras de DNA complementario (cDNA, *complementary DNA*) fueron sinterizadas a partir del RNA extraído de las células Caco-2 utilizando el kit PrimeScript RT (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japón) siguiendo las instrucciones del fabricante y se utilizó un NanoDrop 3300 (Thermo Fisher Scientific) para determinar su concentración. Las muestras de cDNA se conservaron a -80°C hasta su análisis por RT-qPCR.

3.5. Condiciones de amplificación de los métodos de RT-qPCR

La RT-qPCR se llevó a cabo como técnica de amplificación y detección de ácidos nucleicos, caracterizada por su alta sensibilidad y especificidad de secuencia (28). Las reacciones de RT-qPCR se realizaron utilizando el sistema SYBR Green Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc.) en un instrumento ViiA 7 (Applied Biosystems, Foster City, EE. UU) y los resultados visualizados en el *software* ViiA 7 v1.2.4. (Applied Biosystems).

Las reacciones se realizaron en placas de 384 pocillos con volumen final de 12 µL por pocillo, compuesto por: 6,25 µL de SYBR Green Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc.), 0,375 µL de cebador directo a 10 µM, 0,375 µL de cebador reverso a 10 µM, 2,38 µL de agua libre de RNAsas, 0,12 µL de ROX (Takara Bio Inc.) y 2,5 µL gDNA o cDNA dependiendo del experimento. Como control negativo se incluyeron pocillos sin DNA (NTC, *no template control*). En la Tabla 2 se recogen los parámetros de temperatura y duración utilizados en las etapas de preincubación, predesnaturalización, desnaturalización e hibridación/extensión de las tres condiciones de amplificación (A, B y C) empleadas en este trabajo.

3.6. Determinación de la eficiencia de los métodos de RT-qPCR

Con el objetivo de optimizar los sistemas de RT-qPCR, se evaluó la especificidad y eficiencia de las parejas de cebadores seleccionadas y diseñadas para *IL13*, *IL10*, *ALDH1A1*, *ALDH1A2*, *JAG2* y *GATA3*, utilizando gDNA humano procedente de individuos sanos en las condiciones descritas. La especificidad de la amplificación se evaluó mediante el análisis de las curvas de disociación (*melting curves*), considerando la temperatura de fusión (T_m) característica de cada amplicón. Esto permitió identificar las

condiciones de reacción más adecuadas para cada par de cebadores y descartar aquellas que generaban productos inespecíficos.

Tabla 2. Condiciones de amplificación de RT-qPCR. Parámetros técnicos utilizados durante las diferentes etapas.

Condición	Etapas de amplificación			
	Preinc. ¹	Predesnat. ²	Desnat. ³	Hib/Ext. ⁴
	T ⁵ / Tiempo / Ci ⁶	T ^a / Tiempo / Ci	T ^a / Tiempo / C	T ^a / Tiempo / C
A	50°C / 2 min / Ci - 1	95°C / 10 min / Ci - 1	95°C / 15 s / Ci - 40	60°C / 1 min / Ci - 40
B	50°C / 2 min / Ci - 1	95°C / 10 min / Ci - 1	95°C / 15 s / Ci - 40	62°C / 45 s / Ci - 40
C	50°C / 2 min / Ci - 1	95°C / 5 min / Ci - 1	95°C / 15 s / Ci - 40	58°C / 45 s + 60°C / 15 s / Ci - 40

¹Preinc., preincubación; ²Predesnat., predesnaturalización; ³Desnat., desnaturalización;

⁴Hib/Ext., hibridación/extensión. ⁵T, temperatura; ⁶Ci, ciclos de amplificación.

La eficiencia de amplificación (E) de las reacciones se determinó mediante el análisis de curvas de regresión lineal por mínimos cuadrados generadas a partir de diluciones seriadas de gDNA en un rango de 0,005 a 50 ng/μL. Los valores de ciclo umbral (Ct, *cycle threshold*), obtenidos automáticamente por el *software* del sistema de RT-qPCR utilizando un umbral de fluorescencia constante, se representaron frente al logaritmo de la concentración inicial de gDNA. La calidad del ajuste se valoró mediante el coeficiente de determinación (R²), considerándose aceptables las curvas con valores superiores a 0,95. La eficiencia de amplificación se calculó a partir de la pendiente (m) de la recta de regresión mediante la Ecuación 1 y se expresó como porcentaje según la Ecuación 2. Se consideraron óptimas aquellas condiciones de reacción con eficiencias comprendidas entre el 90% y el 110% (30,31).

$$E = 10^{\frac{-1}{m}} \quad (1)$$

$$E (\%) = (E - 1) \times 100 \quad (2)$$

Ecuación 1 y 2: Cálculo de la eficiencia de amplificación. (1) E representa la eficiencia de amplificación y m la pendiente de la regresión lineal. (2) Expresa la eficiencia en porcentaje.

3.7. Análisis de la expresión génica relativa de los genes diana mediante RT-qPCR

La cuantificación de la expresión génica relativa se realizó mediante el método de expresión relativa se basa en la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (29), normalizando la expresión de los genes diana utilizando como gen de referencia *GAPDH* y las muestras referidas al control negativo del cultivo (CTRL; incubadas exclusivamente con medio), utilizadas como

calibrador en este ensayo. A partir de los valores de Ct se calcularon los ΔCt (gen diana frente a gen de referencia) y $\Delta\Delta Ct$ (muestra experimental frente a muestra calibradora). Los valores de expresión relativa se calcularon aplicando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (29).

Se eligió este método en lugar del modelo corregido por eficiencia de Pfaffl (30), ya que este método asume eficiencias de amplificación próximas al 100% y equivalentes entre el gen diana y el gen de referencia, condición que se verificó experimentalmente, mostrando eficiencias comparables dentro del rango aceptado en cuantificación relativa.

3.8. Análisis estadístico

Las curvas de eficiencia se representaron con Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, EE. UU) mediante una regresión lineal por mínimos cuadrados y la bondad del ajuste se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R^2). Los datos de expresión génica obtenidos de RT-qPCR se representaron (y analizaron estadísticamente con el programa GraphPad Prism v11.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, EE. UU). La distribución estadística de los resultados de expresión relativa se evaluó empleando el test de Saphiro-Wilk y las diferencias significativas de estos datos se determinaron utilizando ANOVA de una vía seguido del test *post hoc* Tukey de comparaciones múltiples para identificar las diferencias entre las condiciones experimentales evaluadas. Como umbral de significación estadística, se estableció un valor de $p \leq 0,05$.

3.9. Empleo de herramientas de inteligencia artificial

El uso de herramientas de inteligencia artificial (IA), incluyendo ChatGPT, Copilot, y NotebookLM se ha limitado exclusivamente a tareas de apoyo en la redacción, estructuración y mejora del estilo del manuscrito. Estas herramientas no han intervenido en la generación, análisis, interpretación de datos experimentales, ni en la selección de bibliografía.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Selección y diseño de cebadores para estudiar la expresión génica por RT-qPCR

Con el fin de desarrollar métodos de RT-qPCR óptimos que permitiesen cuantificar la expresión de *ALDH1A1*, *ALDH1A2*, *IL10*, *IL13*, *GATA3*, *JAG2*, *PGE*, *TGFB1*, *TLR2* y *TLR4* en las células epiteliales de intestino humano que se emplearon en este trabajo, inicialmente se identificaron posibles opciones de parejas de cebadores dirigidas a cada un gen para su evaluación *in silico*. Se priorizaron aquellos cebadores previamente utilizados en estudio de expresión con enterocitos y cultivos de líneas celulares intestinales humana que se hubieran empleado en RT-qPCR basadas en la metodología SYBR Green. Dependiendo de la disponibilidad de cebadores para cada gen, el índice de impacto, la relevancia de la revista en el área de investigación y el número de citas acumuladas por la publicación que hubiesen utilizado los cebadores identificados, se eligieron de 5 a 10 parejas dependiendo de cada gen diana. La idoneidad se estableció en base a la adecuación de estos cebadores a criterios técnicos de consenso (Tabla 1) mediante su análisis con Primer-BLAST (NCBI), PRIMER 3 Plus (Wageningen University) y Primer Quest (Integrated DNA Technologies). Aunque la mayor parte de los cebadores evaluados tenían parámetros óptimos en lo relativo a su contenido en guanina y citosina (45% - 55%), longitud de la secuencia (20 - 22 pb) y Tm (58% - 62%), se desestimó un elevado número de candidatos por la aparición de horquilla y la existencia de dimerizaciones tanto propios como con el otro cebador de la pareja. Las parejas seleccionadas para su validación experimental (Anexo I) mostraron que las posibles dimerizaciones conjuntas eran menores de tres, que las dimerizaciones propias eran inferiores a dos y que no existía la posibilidad de que los cebadores formasen horquillas, cumpliendo en gran medida con los requerimientos de adecuación (Tabla 1) (24).

Por otro lado, se encontró un limitado número de cebadores para *JAG2* (ninguna pareja), *ALDH1A1* (una pareja; (31)) y *ALDH1A2* (dos pareja; (32)) que cumpliesen los criterios de adecuación en estudios de expresión mediante RT-qPCR utilizando SYBR Green. Ante esta situación, se decidió proceder al diseño de parejas de cebadores para estos genes *de novo* y se generaron tres parejas de cebadores para *JAG2* (*JAG2.I*, *JAG2.II* y *JAG2.III*) y dos parejas para los genes *ALDH1A1* (*ALDH1A1.II* y *ALDH1A1.III*) y *ALDH1A2* (*ALDH1A2.II* y *ALDH1A2.III*), utilizando como punto de partida para su diseño las secuencias de estos genes con referencia de acceso NM_002226.5 (*JAG2*), NM_000689.5 (*ALDH1A2*) y NM_003888.4 (*ALDH1A2*) en la base de datos GenBank (NIH). Las

nuevas parejas de cebadores fueron analizadas como se describe anteriormente para determinar los parámetros de adecuación (Tabla 1) y se seleccionaron aquellas que cumplieron su cumplimiento con los criterios de establecidos (Anexo I).

4.2. Validación de las condiciones de amplificación de los métodos de RT-qPCR

Una vez seleccionados los cebadores, se procedió a la optimización de las condiciones de reacción para cada sistema de amplificación. Como punto de partida, se emplearon las condiciones descritas en la bibliografía para cada par de cebadores (24). A partir de estas, se realizaron modificaciones en los distintos parámetros de reacción con el objetivo de establecer un conjunto de condiciones experimentales lo más homogéneo posible. De este modo, se buscó obtener un protocolo estandarizado que permitiera la amplificación eficiente y específica de los diferentes genes analizados minimizando el número de variantes de reacción necesarias. La optimización de las condiciones de reacción se realizó mediante RT-qPCR utilizando química basada en SYBR Green. Las condiciones de reacción seleccionadas fueron aquellas que presentaron amplificaciones específicas con valores de eficiencia dentro de los rangos aceptados para RT-qPCR (33,34) y una adecuada linealidad de la curva de eficiencia.

Inicialmente, se evaluó una pareja de cebadores para el gen *IL13* bajo la condición A (1 ciclo a 50°C durante 2 min; 1 ciclo a 95 °C durante 10 min; 40 ciclos a 95°C durante 15 s y 40 ciclos a 60 °C durante 60 s). *IL13* presentó valores de Ct elevados incluso en la mayor concentración de molde (5 ng/μL; $Ct = 32,18 \pm 2,21$), sin observarse la disminución progresiva esperada a medida que aumentaba la concentración de gDNA, lo que indica ausencia de relación dosis-respuesta, consistente con una amplificación ineficiente (Figura 2). Además, el análisis de las curvas de disociación no evidenció la obtención de un producto de amplificación específico, ya que no se observó una T_m única y reproducible a lo largo de todas las concentraciones evaluadas, sino perfiles de disociación heterogéneos incompatibles con la presencia de un único amplicón. Esta falta de especificidad pudo contrastarse experimentalmente mediante la comparación con el gen de referencia *GAPDH*, cuyo par de cebadores generó un único pico de disociación constante y reproducible ($82,39 \pm 0,22$ °C) en todas las condiciones analizadas, lo que es indicativo de una amplificación específica.

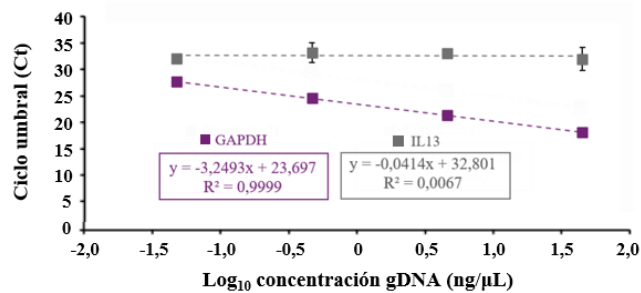


Figura 2. Análisis de la eficiencia de amplificación de *IL13* y *GAPDH* mediante RT-qPCR. Curva de regresión lineal de los valores de ciclo umbral (Ct) obtenidos para diluciones seriadas de DNA genómico. Se muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2) de cada pareja de cebadores utilizada para amplificar *IL13* (gris) y *GAPDH* (morado). Media de Ct $\pm$ SD de triplicados técnicos.

Por ello esta pareja de cebadores, no es adecuada para el análisis de la expresión génica de *IL13* humana bajo las condiciones experimentales empleadas. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de validar experimentalmente los cebadores descritos en la literatura en las condiciones específicas de trabajo, así como de considerar el uso de más de una pareja de cebadores durante la fase de selección para identificar oligonucleótidos adecuados para el análisis de expresión génica.

En el caso del gen *IL10*, y en línea con la necesidad de evaluar diferentes parejas de cebadores, se analizaron dos parejas (IL10.I e IL10.II) en la condición A. Ambos permitieron la amplificación en todas las concentraciones de gDNA ensayadas. No obstante, la pareja IL10.II mostró una linealidad insuficiente en la curva de eficiencia (R^2 0,84), lo que sugiere un rendimiento cuantitativo subóptimo en las condiciones experimentales utilizadas. Por el contrario, IL10.I presentó una elevada linealidad y eficiencia (R^2 0,99; E 105% respectivamente), confirmando una adecuada correlación entre los valores de Ct y la concentración inicial de gDNA (Figura 3).

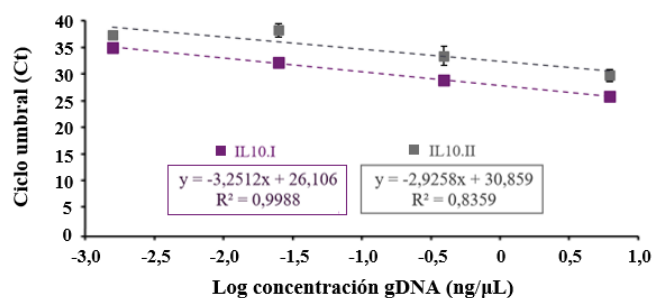


Figura 3. Análisis de la eficiencia de amplificación de *IL10* mediante RT-qPCR. Curvas de regresión lineal derivadas de los valores de ciclo umbral (Ct) obtenidos para diluciones seriadas de DNA genómico. Se muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2) de la pareja de cebadores IL10.I (morado) e IL10.II (gris). Media de Ct $\pm$ SD de triplicados técnicos.

El análisis de las curvas de disociación evidenció además diferencias claras en la especificidad de los productos generados. En el caso de IL10.I se observó un único producto específico con una T_m constante en todas las concentraciones analizadas de $83,34 \pm 0,14$ °C, lo que confirma una amplificación específica del gen diana. Por el contrario, IL10.II presentó múltiples picos de fusión, reflejando eventos de amplificación no específica en estas condiciones (Figura 4). No obstante, dado que ambas parejas habían

sido descritas previamente en la bibliografía (35,36), se plantea la necesidad de evaluar condiciones de reacción adicionales antes de descartar la utilización de IL10.II.

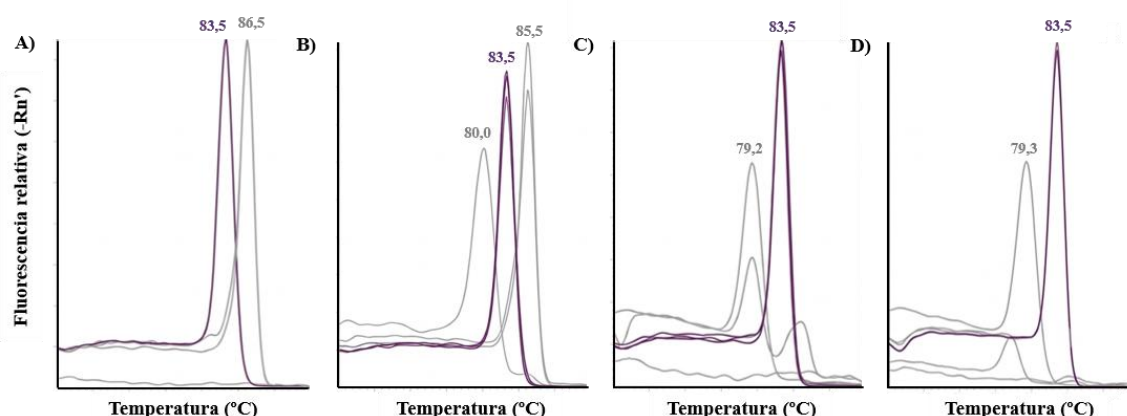


Figura 4. Curvas de disociación del producto de amplificación de RT-qPCR para *IL10*. Fluorescencia relativa acumulada (-Rn') con respecto al incremento de la temperatura obtenidas a partir de 5 ng/μL (A), 0,5 ng/μL (B), 0,05 ng/μL (C) y 0,005 ng/μL (D) de ADN genómico para la pareja de cebadores IL10.I (morado) e IL10.II (gris).

Por otra parte, dadas las limitadas opciones de cebadores de *JAG2*, *ALDH1A1* y *ALDH1A2* existente en la bibliografía y los pocos que se adecuaron a los criterios establecidos, para estos genes decidimos diseñar nuevas parejas para contar con un total de tres parejas candidatas para su evaluación. El procedimiento convencional seguido cuando se emplean cebadores generados *de novo* consiste evaluar su capacidad de amplificación en tres condiciones de reacción (Tabla 2) que difieren en la duración y temperatura de las etapas de predesnaturalización e hibridación/extensión, para poder determinar la óptima en cada caso.

En el caso de *JAG2* y *ALDH1A1* no se observó amplificación específica en ninguna de las condiciones ensayadas, lo que sugiere una hibridación subóptima con la secuencia diana o una incompatibilidad de estas parejas de cebadores con los parámetros de reacción evaluados. En concreto, para *JAG2* se incluyen entre las posibles causas características desfavorables del diseño del amplicón, como su longitud (329, 248 y 166 pares de bases del producto por las parejas JAG2.I, JAG2.II y JAG2.III, respectivamente), lo que puede afectar negativamente a la eficiencia de amplificación en qPCR, especialmente cuando supera el rango óptimo descrito en la literatura (24).

En contraste, una de las parejas de cebadores evaluadas para *ALDH1A2*, ALDH1A2.I, mostró amplificación específica en las condiciones B y C, confirmada por la obtención del producto específico con Tm de $82,92 \pm 0,06^{\circ}\text{C}$ y $82,97 \pm 0,06^{\circ}\text{C}$ respectivamente. Dado que ambas condiciones permitieron la amplificación específica del fragmento diana,

la selección final se basó en la eficiencia de la reacción obtenida a partir de las curvas de eficiencia estudiadas (Figura 5). En este caso, la condición B presentó una mayor eficiencia (104 %) en comparación con la condición C (99 %), por lo que fue seleccionada como la condición óptima para este sistema de amplificación.

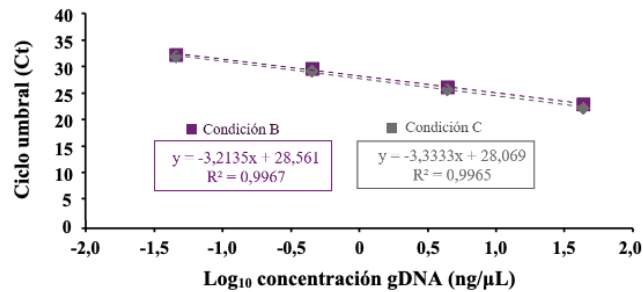


Figura 5. Análisis de la eficiencia de amplificación de *ALDH1A2* mediante RT-qPCR. Curvas de regresión lineal derivadas de los valores de ciclo umbral (Ct) obtenidos para diluciones seriadas de DNA genómico. Se muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2) de la pareja de cebadores *ALDH1A2.I* utilizando los parámetros establecidos para la condición B (morado) y C (gris). Media de Ct $\pm$ SD de triplicados técnicos.

Por último, se analizaron tres parejas de cebadores (*GATA3.I*, *GATA3.II* y *GATA3.III*) dirigidos al gen *GATA3* únicamente bajo la condición A. Aunque, como se ha señalado anteriormente, la evaluación de distintas condiciones térmicas constituye una estrategia recomendable para optimizar la amplificación, las tres parejas de cebadores mostraron productos específicos en esta condición, por lo que se decidió no evaluar las otras condiciones de amplificación (B y C). Para la elección de los cebadores más adecuados, se determinaron las eficiencias de las tres parejas observándose valores muy similares para todas las opciones (Anexo I), eligiéndose la pareja *GATA3.III* al presentar un porcentaje de eficiencia ligeramente superior al resto (105%).

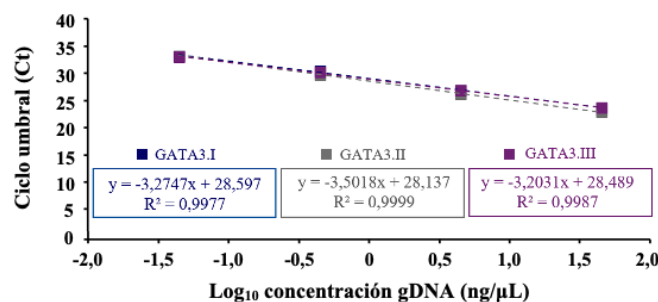


Figura 6. Análisis de la eficiencia de amplificación de *GATA3* mediante RT-qPCR. Curvas de regresión lineal derivadas de los valores de ciclo umbral (Ct) obtenidos para diluciones seriadas de DNA genómico. Se muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2) de las parejas de cebadores *GATA3.I* (azul), *GATA3.II* (gris) y *GATA3.III* (morado). Media de Ct $\pm$ SD de triplicados técnicos.

La correcta evaluación de las respuestas alérgicas derivadas de las células del epitelio intestinal es crítica para la adecuada ejecución de este trabajo. Esta respuesta se caracteriza principalmente por la secreción de citoquinas alarminas (*IL-33*, *IL-25* y *TSLP*) por parte de estas células y la determinación de los cambios en los genes que codifican para estas (*IL33*, *IL25* y *TSLP*) es de gran relevancia. En este caso, las parejas de cebadores empleadas para la amplificación específica de estos genes habían sido previamente diseñadas y validadas por el grupo del CIAL (Anexo II). No obstante, con el

fin de confirmar su idoneidad bajo las condiciones experimentales utilizadas en este estudio, se evaluaron su eficiencia de amplificación y la T_m del producto utilizando la condición B (Tabla 3).

Tabla 3. Métodos de RT-qPCR validados para *IL10*, *GATA3*, *IL33*, *IL25*, *TSLP* y *ALDH1A2*. Condiciones de amplificación y parámetros de especificidad y eficiencia validados para la determinación de la expresión de los genes objeto de estudio de este trabajo.

Pareja de cebadores	Condición de amplificación	Temperatura <i>melting</i> (T _m)	Eficiencia	Eficiencia (%)
IL10.I	A Preinc. ¹ 50 °C / 2 min Predesnat. ² 95 °C / 10 min Desnat. ³ 95 °C / 15 s Hib/Ext. ⁴ 60 °C / 1 min	83,34 ± 0,14	2,03	103
GATA3.I		83,55 ± 0,09	2,02	102
GATA3.II		83,13 ± 0,05	1,93	93
GATA3.III		88,63 ± 0,12	2,05	105
IL33	B Preinc. ¹ 50 °C / 2 min Predesnat. ² 95 °C / 10 min Desnat. ³ 95 °C / 15 s Hib/Ext. ⁴ 60 °C / 45 s	81,41 ± 0,13	1,94	94
IL25		79,53 ± 0,20	2,13	103
TSLP		84,77 ± 0,22	1,80	87
ALDH1A2.I		82,92 ± 0,06	2,04	104
ALDH1A2.I	C Preinc. ¹ 50 °C / 2 min Predesnat. ² 95 °C / 10 min Desnat. ³ 95 °C / 15 s Hib/Ext. ⁴ 58 °C / 45 s + 60 °C / 15 s	82,97 ± 0,06	1,99	99

¹Preinc., preincubación; ²Predesnat., predesnaturalización; ³Desnat., desnaturalización; ⁴Hib/Ext., hibridación/extensión.

Los resultados confirmaron la amplificación específica de los genes diana, el mantenimiento de valores de eficiencia dentro de los rangos aceptados y la obtención de productos de amplificación con valores de T_m concordantes con los descritos previamente por el grupo (Figura 7).

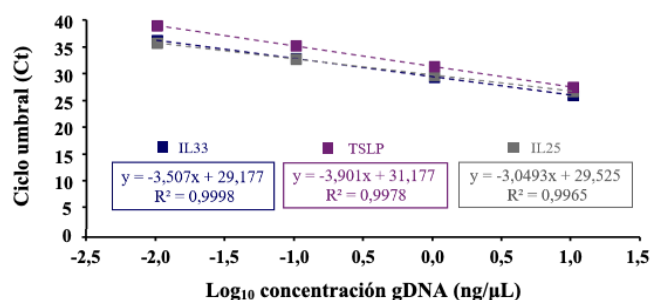


Figura 7. Análisis de la eficiencia de amplificación de *IL33*, *IL25* y *TSLP* mediante RT-qPCR. Curvas de regresión lineal derivadas de los valores de ciclo umbral (Ct) obtenidos para diluciones seriadas de DNA genómico. Se muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R²) de las parejas de cebadores IL33 (azul), IL25 (gris) y TSLP (morado). Media de Ct ± SD de triplicados técnicos.

Los ensayos realizados permitieron optimizar y validar las condiciones de amplificación de los genes implicados en la respuesta inflamatoria y reguladora del epitelio intestinal,

completando la puesta a punto de los sistemas de qPCR no establecidos previamente en el laboratorio. Los resultados confirmaron la especificidad y eficiencia de las parejas de cebadores seleccionadas, disponiendo así de un panel de marcadores para el estudio de la inflamación alérgica (Tabla 3). A partir de este punto, se evaluaron las propiedades tolerogénicas inducidas por un péptido con actividad inmunomoduladora en el contexto de la alergia a la clara de huevo.

4.3. Evaluación del efecto inmunomodulador y tolerogénico de péptidos derivados de la ovoalbúmina hidrolizada con pepsina

Para el estudio del efecto de la OVA y del hidrolizado OP sobre las células del epitelio intestinal humano se empleó un modelo de cocultivo *in vitro* en cámaras *Transwell*, constituido por células Caco-2 en el compartimento apical y PBMCs de donantes no alérgicos en el compartimento basal. Debido a la imposibilidad ética y práctica de obtener biopsias intestinales de sujetos pediátricos sanos, se utilizó este modelo previamente establecido y ampliamente empleado para el estudio de la interacción de alérgenos alimentarios con la barrera intestinal humana (37,38). Tras la estimulación con LPS, RA, OVA y distintas concentraciones de OP (2, 20 y 200 ng/mL), se procedió al aislamiento de RNA total y a la síntesis de DNAc, cuya concentración y pureza se evaluaron mediante espectrofotometría (Anexo IV).

Los valores de $A_{260/280}$ del RNA oscilaron entre 2,04 y 2,14, mientras que los de $A_{260/230}$ variaron entre 1,29 y 2,18. En general, la mayoría de las muestras presentaron una pureza adecuada, si bien se observó una mayor variabilidad en el valor de $A_{260/230}$ asociada a una incidencia durante la purificación, en la que se utilizó etanol al 100 % en lugar de etanol al 70 % (v/v) en el paso de lavado de la membrana. Esta desviación afectó a los triplicados de las condiciones OP20, que mostraron valores de $A_{260/230}$ entre 1,70 y 1,95, compatibles con la posible presencia de contaminantes residuales. Aunque estas muestras se incluyeron en los análisis posteriores, se recomienda repetir la extracción para confirmar su pureza.

Tras la retrotranscripción, el cDNA presentó ratios $A_{260/280}$ comprendidos entre 1,59 y 1,80 y valores de $A_{260/230}$ entre 1,88 y 2,23. En general, la calidad del cDNA fue adecuada, salvo la muestra OP200 2, que mostró un valor de $A_{260/230}$ de 1,24; indicativo de posibles compuestos residuales derivados del proceso de síntesis. Las concentraciones de cDNA oscilaron entre 421,0 y 894,3 ng/ μ L.

Las muestras de cDNA obtenidas se utilizaron para el análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR, siguiendo los métodos previamente desarrollados y validados en este trabajo. En particular, se evaluaron los cambios en la expresión de genes asociados a respuestas inflamatorias de tipo alérgico, incluyendo *PGE*, *GATA3*, *IL33*, *IL25* y *TSLP*. Asimismo, se analizó la posible inducción de mecanismos inmunomoduladores y tolerogénicos promovidos por OP mediante la expresión de *ALDH1A2* y *TGFB1*.

Además, en base a resultados previos obtenidos en modelos murinos en los que se ha observado que uno de los posibles mecanismos antiinflamatorios inducidos por OP reside en el reconocimiento de sus péptidos por los receptores TLR2 y TLR4 (39), la expresión de los genes que codifican para estas moléculas también fue evaluada, considerando no solo su posible implicación en respuestas proinflamatorias, sino también su participación en procesos de regulación inmunitaria.

En este contexto, no se detectó amplificación de *ALDH1A2* en ninguna de las condiciones experimentales evaluadas. Dado que este sistema de RT-qPCR había sido previamente validado mediante amplificación de gDNA, la ausencia de señal observada probablemente refleja una expresión baja o indetectable de este gen en las células Caco-2. Este resultado es consistente con la literatura, que describe a *ALDH1A2* como la principal isoforma productora de RA en DCs intestinales, mientras que las células epiteliales expresan preferentemente *ALDH1A1* para contribuir al metabolismo local de la vitamina A y al mantenimiento de la homeostasis intestinal (40,41). De igual manera, no se observó amplificación del gen *IL25* en ninguna de las condiciones experimentales, resultado que contrasta con las observaciones previas realizadas en el laboratorio que mostraron un aumento en la expresión de *IL25* en las células Caco-2 al incubarse con los alérgenos de la clara de huevo cocultivadas tanto con PBMCs de pacientes tanto alérgicos como no alérgicos (38).

Los resultados obtenidos en el ensayo de cocultivo con células Caco-2 mostraron que el tratamiento con OVA indujo un aumento significativo en la expresión de *PGE*, *GATA3*, *TSLP* e *IL33* en comparación con el grupo control. Asimismo, el tratamiento con RA redujo significativamente la expresión de todos los genes analizados con respecto al grupo tratado con OVA. Por su parte, la estimulación con el hidrolizado de OP no produjo cambios significativos en la expresión de *PGE* en ninguna de las concentraciones evaluadas. Sin embargo, la expresión de *TSLP* disminuyó significativamente tras el tratamiento con OP a 20 ng/mL. En contraste, la reducción significativa de la expresión

de *GATA3* e *IL33* se observó cuando las células fueron tratadas con OP a una concentración de 200 ng/mL (Figura 8).

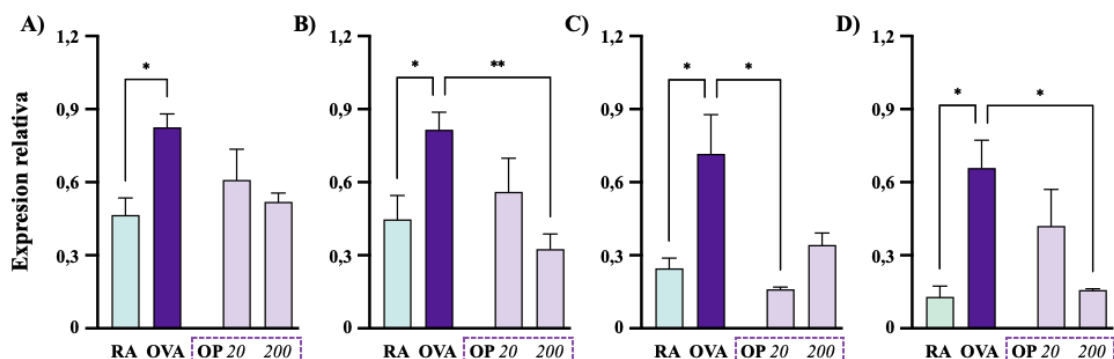


Figura 8. Efecto de la ovoalbúmina (OVA) y su hidrolizado con pepsina (OP) en la respuesta alérgica del epitelio intestinal. Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de *PGE* (A), *GATA3* (B), *TSLP* (C) e *IL33* (D) en células Caco-2 cocultivadas con células mononucleares de sangre periférica (n=3) durante 24 horas en presencia de ácido retinoico (RA, 30 ng/mL), OVA (200 ng/mL) y OP (20 ng/mL y 200 ng/mL). Las barras representan la media de los triplicados +SEM. Diferencias significativas obtenidas por ANOVA de una vía seguido del test Tukey de comparaciones múltiples (*p < 0,05; **p < 0,01).

Los resultados obtenidos apoyan las propiedades inmunomoduladoras previamente descritas para los péptidos derivados del hidrolizado con pepsina en modelos *in vitro* e *in vivo* en ratón (22,23,42). En particular, este hidrolizado redujo la expresión de las alarminas TSLP e IL-33 en estas células. Este efecto es consistente con observaciones previas realizadas con péptidos derivados de OVA en el mismo modelo celular (43) y con los resultados obtenidos en cultivos *ex vivo* de células intestinales de ratones *naïve* y alérgicos a la clara de huevo expuestas a OVA y a OP donde además también se observó una disminución de los niveles de IL-33 secretada en el sobrenadante de cultivo (23).

El tratamiento con OVA redujo la expresión de *TLR4* con respecto al grupo control, mientras que la estimulación con LPS indujo un aumento significativo de su expresión en comparación con el resto de las condiciones ensayadas. Por su parte, el tratamiento con el hidrolizado de OP a 20 ng/mL incrementó significativamente la expresión de *TLR4* con respecto al grupo tratado con OVA, alcanzando niveles similares a los observados con RA. En contraste, no se detectaron cambios significativos en la expresión de *TLR2* en ninguna de las condiciones evaluadas (Figura 9).

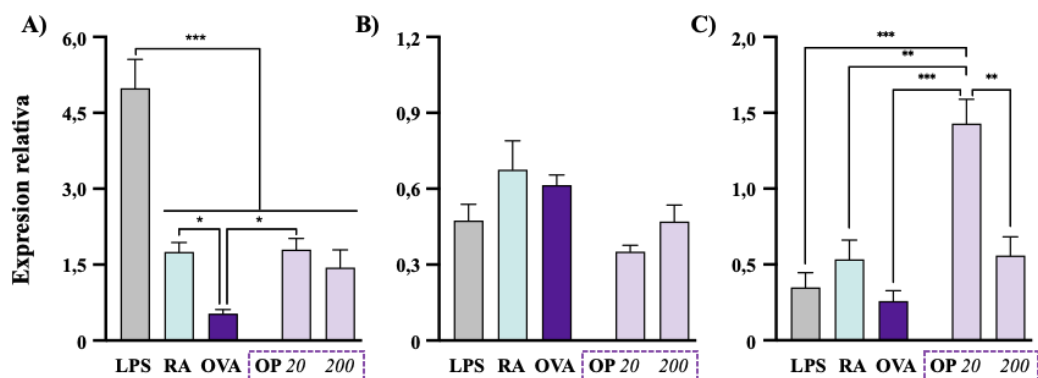


Figura 9. Efecto de la ovoalbúmina (OVA) y su hidrolizado con pepsina (OP) en la respuesta tolerogénica del epitelio intestinal. Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de *TLR4* (A), *TLR2* (B) y *TGFB1* (C) en células Caco-2 cocultivadas con células mononucleares de sangre periférica (n=3) durante 24 horas en presencia de lipopolisacárido (LPS; a 10 ng/mL), ácido retinoico (RA, 30 ng/mL), OVA (200 ng/mL) y OP (20 ng/mL y 200 ng/mL). Las barras representan la media de los triplicados +SEM. Diferencias significativas obtenidas por ANOVA de una vía seguido del test Tukey de comparaciones múltiples (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Entre los mecanismos de acción descritos para la inducción de tolerancia intestinal por el hidrolizado OP en modelos murinos es el aumento de la expresión de *TLR2*, *TLR4* y *TLR5* en células epiteliales y dendríticas, lo que pone de manifiesto el papel esencial del reconocimiento de estos péptidos por los TLRs en la síntesis de RA y en la promoción de señales tolerogénicas (39). En este contexto, los resultados no mostraron un incremento de la expresión de *TLR2* en células Caco-2 tras la activación con el hidrolizado (Figura 9), aunque tampoco se observaron cambios en las muestras incubadas con RA, lo que sugiere diferencias en la regulación de este receptor entre humanos y ratones (44). Sin embargo, tanto el hidrolizado como el RA incrementaron la expresión de *TLR4* en las células Caco-2, en concordancia con el posible efecto de OP sobre células epiteliales intestinales a través de la interacción con estos receptores de baja especificidad (39). Este resultado resulta especialmente relevante dado que *TLR4* es uno de los receptores de reconocimiento de patrones más abundantemente expresados en el epitelio intestinal y se ha relacionado con mecanismos implicados en la inducción de tolerancia intestinal y el mantenimiento de la homeostasis de la barrera epitelial (45,46). Estos resultados sugieren que determinados péptidos presentes en el hidrolizado de OVA podrían promover señales tempranas de carácter regulador mediante la activación de este receptor, favoreciendo un entorno menos propenso al desarrollo de respuestas alérgicas (47).

El hidrolizado indujo además un aumento de la expresión de *TGFB1*, gen que codifica para *TGF-β*, una citocina clave en el establecimiento y mantenimiento de respuestas inmunitarias tolerogénicas a nivel intestinal. Este resultado concuerda con observaciones

previas en modelos *ex vivo* (23) e *in vivo* (22,42), lo que revela la importancia del OP en la promoción de la homeostasis intestinal a través de la producción de esta citoquina.

Asimismo, los resultados mostraron la capacidad de OP para contrarrestar el efecto de la OVA sobre la reducción de la expresión de *TGFB1*, promoviendo señales de carácter tolerogénico que se tradujeron en un aumento de la expresión de este gen. Este efecto fue comparable al observado con el RA, molécula clave en los mecanismos inmunológicos implicados en la inducción de la tolerancia oral, al favorecer la activación de células dendríticas con perfil tolerogénico y la generación de células Tregs Foxp3⁺RORγt⁺, esenciales para el establecimiento y mantenimiento de la tolerancia oral (48).

Los resultados obtenidos son consistentes con los descritos previamente en modelos murinos, en los que los péptidos inmunomoduladores derivados de OP demostraron un efecto terapéutico frente a la alergia a las proteínas de la clara de huevo. Asimismo, sugieren que estos péptidos podrían ejercer efectos similares en el intestino humano, lo que respalda su potencial utilización como agentes de inmunoterapia oral en sujetos alérgicos a las proteínas de la clara de huevo.

4.4. Impacto sobre los Objetivos de Desarrollo Sostenible

Este trabajo contribuye al cumplimiento de varios Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). En concreto, se alinea con el ODS 3 (Salud y bienestar) mediante la búsqueda de alternativas terapéuticas más seguras y eficientes para el tratamiento de la alergia al huevo. También, tiene relación con el ODS 9 (Industria, innovación e infraestructura) al fomentar la innovación biotecnológica; y con el ODS 4 (Educación de calidad), al contribuir a la generación y difusión de conocimiento científico.

5. CONCLUSIONES

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

1. La estrategia de validación empleada para la selección de cebadores y la optimización de las condiciones de amplificación ha permitido el desarrollo de ensayos de RT-qPCR altamente específicos y eficientes que son adecuados para cuantificar la expresión de genes relacionados con respuestas proinflamatorias de tipo alérgico (*PGE*, *GATA3*, *TSLP* e *IL33*) y otros asociado a mecanismos relacionados con la tolerancia oral (*TGFBI*, *TLR2* y *TLR4*) a partir de RNA extraído de células Caco-2 del epitelio intestinal humano.

2. La hidrólisis de la ovoalbúmina con pepsina (OP) no solo reduce su capacidad para inducir respuestas proalérgicas en células epiteliales mediante la disminución de la expresión génica del factor de transcripción GATA3 y las alarminas epiteliales TSLP e IL-33, sino que también los péptidos contenidos en OP favorecen la expresión del gen que codifica para TGF- β (*TGFBI*), una citocina reguladora con un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis epitelial y en la inducción de tolerancia oral frente a alérgenos alimentarios.

5. 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 (Mex)*. 4 de marzo de 2020;56(3):111. doi:10.3390/medicina56030111 PubMed PMID: 32143431; PubMed Central PMCID: PMC7142605.
2. Bartha I, Almulhem N, Santos AF. Feast for thought: A comprehensive review of food allergy 2021-2023. *J Allergy Clin Immunol*. 1 de marzo de 2024;153(3):576-94. doi:10.1016/j.jaci.2023.11.918 PubMed PMID: 38101757.
3. Bilaver LA, Chadha AS, Doshi P, O'Dwyer L, Gupta RS. Economic burden of food allergy: A systematic review. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol*. abril de 2019;122(4):373-380.e1. doi:10.1016/j.anai.2019.01.014 PubMed PMID: 30703439.
4. Birdi G, Cooke R, Knibb R. Quality of Life, Stress, and Mental Health in Parents of Children with Parentally Diagnosed Food Allergy Compared to Medically Diagnosed and Healthy Controls. *J Allergy*. 2016;2016:1497375. doi:10.1155/2016/1497375 PubMed PMID: 27429624; PubMed Central PMCID: PMC4939330.
5. Akagawa S, Kaneko K. Gut microbiota and allergic diseases in children. *Allergol Int Off J Jpn Soc Allergol*. julio de 2022;71(3):301-9. doi:10.1016/j.alit.2022.02.004 PubMed PMID: 35314107.
6. López-Fandiño R, Molina E, Lozano-Ojalvo D. Intestinal factors promoting the development of ROR γ t⁺ cells and oral tolerance. *Front Immunol*. 2023;14:1294292. doi:10.3389/fimmu.2023.1294292 PubMed PMID: 37936708; PubMed Central PMCID: PMC10626553.
7. Manca E, Demoly P, Caimmi D. IgE-mediated egg allergy in children: Diagnosis and management. *J Allergy Hypersensitivity Dis*. 1 de enero de 2024;1:100003. doi:10.1016/j.jahd.2024.100003
8. Bognanni A, Fiocchi A, Arasi S, Chu DK, Ansotegui I, Assa'ad AH, et al. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) guideline update - XII - Recommendations on milk formula supplements with and without probiotics for infants and toddlers with CMA. *World Allergy Organ J*. abril de 2024;17(4):100888. doi:10.1016/j.waojou.2024.100888 PubMed PMID: 38706757; PubMed Central PMCID: PMC11068951.
9. Leau A, Denery-Papini S, Bodinier M, Dijk W. Tolerance to heated egg in egg allergy: Explanations and implications for prevention and treatment. *Clin Transl Allergy*. diciembre de 2023;13(12):e12312. doi:10.1002/clt2.12312 PubMed PMID: 38146801; PubMed Central PMCID: PMC10734553.
10. Xia X, Li J, Liang R, Li Y, Ma X, Yang Y, et al. Effects of unfolding treatment assisted glycation on the IgE/IgG binding capacity and antioxidant activity of ovomucoid. *Food Funct*. 2 de enero de 2024;15(1):196-207. doi:10.1039/d3fo04035f PubMed PMID: 38047408.
11. Amo A, Rodríguez-Pérez R, Blanco J, Villota J, Juste S, Moneo I, et al. Gal d 6 is the second allergen characterized from egg yolk. *J Agric Food Chem*. 23 de junio de 2010;58(12):7453-7. doi:10.1021/jf101403h PubMed PMID: 20509661.

12. De Silva C, Dhanapala P, Doran T, Tang MLK, Suphioglu C. Molecular and immunological analysis of hen's egg yolk allergens with a focus on YGP42 (Gal d 6). *Mol Immunol.* marzo de 2016;71:152-60. doi:10.1016/j.molimm.2016.02.005 PubMed PMID: 26897338.
13. Jiaqi W, Yanjun C. Research progress on the allergic mechanism, molecular properties, and immune cross-reactivity of the egg allergen Gal d 5. *Front Nutr.* 2023;10:1205671. doi:10.3389/fnut.2023.1205671 PubMed PMID: 37351194; PubMed Central PMCID: PMC10282150.
14. Bos A, van Egmond M, Mebius R. The role of retinoic acid in the production of immunoglobulin A. *Mucosal Immunol.* abril de 2022;15(4):562-72. doi:10.1038/s41385-022-00509-8
15. Martin JC, Bériou G, Heslan M, Chauvin C, Utriainen L, Aumeunier A, et al. Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is constitutively expressed by a subset of conventional dendritic cells and is strongly induced by retinoic acid. *Mucosal Immunol.* enero de 2014;7(1):101-13. doi:10.1038/mi.2013.28
16. Luciani C, Hager FT, Cerovic V, Lelouard H. Dendritic cell functions in the inductive and effector sites of intestinal immunity. *Mucosal Immunol.* enero de 2022;15(1):40-50. doi:10.1038/s41385-021-00448-w PubMed PMID: 34465895.
17. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *J Allergy Clin Immunol.* enero de 2018;141(1):41-58. doi:10.1016/j.jaci.2017.11.003 PubMed PMID: 29157945.
18. Natsume O, Kabashima S, Nakazato J, Yamamoto-Hanada K, Narita M, Kondo M, et al. Two-step egg introduction for prevention of egg allergy in high-risk infants with eczema (PETIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 21 de enero de 2017;389(10066):276-86. doi:10.1016/S0140-6736(16)31418-0 PubMed PMID: 27939035.
19. Ghouri H, Habib A, Nazir Z, Lohana N, Akilimali A. Omalizumab for the reduction of allergic reactions to foods: a narrative review. *Front Allergy.* 28 de mayo de 2024;5. doi:10.3389/falgy.2024.1409342
20. Zhang Y, Liang B, Tian L, Chen B, Wu S. Systematic review and meta-analysis of omalizumab for IgE-mediated food allergy in children and young adults. *Front Immunol.* 23 de octubre de 2025;16. doi:10.3389/fimmu.2025.1690650
21. Gil CR, Vázquez D, Machinena-Spera A, Jiménez MDMF, Lozano-Blasco J, Feijoo RJ, et al. Tolerance to cooked egg in infants with risk factors for egg allergy after early introduction of baked egg. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2025;53(2):59-66. doi:10.15586/aei.v53i2.1257 PubMed PMID: 40088023.
22. 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. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* octubre de 2017;47(10):1342-54. doi:10.1111/cea.12989 PubMed PMID: 28763132.
23. 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.* septiembre de 2019;63(17):e1900144. doi:10.1002/mnfr.201900144 PubMed PMID: 31140734.

24. Bustin SA, Ruijter JM, van den Hoff MJB, Kubista M, Pfaffl MW, Shipley GL, et al. MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines. *Clin Chem.* 1 de junio de 2025;71(6):634-51. doi:10.1093/clinchem/hvaf043
25. Versmessen N, Van Simaey L, Negash AA, Vandekerckhove M, Hulpiau P, Vaneechoutte M, et al. Comparison of DeNovix, NanoDrop and Qubit for DNA quantification and impurity detection of bacterial DNA extracts. *PloS One.* 2024;19(6):e0305650. doi:10.1371/journal.pone.0305650 PubMed PMID: 38885212; PubMed Central PMCID: PMC11182499.
26. Desjardins P, Conklin D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *J Vis Exp JoVE.* 22 de noviembre de 2010;(45):2565. doi:10.3791/2565 PubMed PMID: 21189466; PubMed Central PMCID: PMC3346308.
27. Explanatory Chapter: Nucleic Acid Concentration Determination. *ResearchGate.* doi:10.1016/B978-0-12-420037-1.00018-X
28. Artika IM, Dewi YP, Nainggolan IM, Siregar JE, Antonjaya U. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes.* 16 de diciembre de 2022;13(12):2387. doi:10.3390/genes13122387 PubMed PMID: 36553654; PubMed Central PMCID: PMC9778061.
29. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* diciembre de 2001;25(4):402-8. doi:10.1006/meth.2001.1262 PubMed PMID: 11846609.
30. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 1 de mayo de 2001;29(9):e45-e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45 PubMed PMID: 11328886.
31. Nautiyal J, Kanwar SS, Yu Y, Majumdar AP. Combination of dasatinib and curcumin eliminates chemo-resistant colon cancer cells. *J Mol Signal.* 20 de julio de 2011;6:7. doi:10.1186/1750-2187-6-7 PubMed PMID: 21774804; PubMed Central PMCID: PMC3162943.
32. Kim H, Lapointe J, Kaygusuz G, Ong DE, Li C, van de Rijn M, et al. The retinoic acid synthesis gene ALDH1a2 is a candidate tumor suppressor in prostate cancer. *Cancer Res.* 15 de septiembre de 2005;65(18):8118-24. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4562 PubMed PMID: 16166285.
33. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* abril de 2009;55(4):611-22. doi:10.1373/clinchem.2008.112797 PubMed PMID: 19246619.
34. Juutinen A, Tiwari A, Hokajärvi AM, Luomala O, Kolehmainen A, Nurmi E, et al. The effects of RT-qPCR standards on reproducibility and comparability in monitoring SARS-CoV-2 levels in wastewater. *Sci Rep.* 26 de octubre de 2024;14(1):25582. doi:10.1038/s41598-024-77155-6 PubMed PMID: 39462074; PubMed Central PMCID: PMC11513023.
35. Li L, Yang H, Li Y, Li XD, Zeng TT, Lin SX, et al. Hypoxia restrains the expression of complement component 9 in tumor-associated macrophages promoting non-small cell lung cancer progression. *Cell Death Discov.* 7 de junio de 2018;4(1):63. doi:10.1038/s41420-018-0064-3

36. Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne R, Bouillon R, Mathieu C. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech JBT*. marzo de 2003;14(1):33-43. PubMed PMID: 12901609; PubMed Central PMCID: PMC2279895.
37. Lozano-Ojalvo D, Benedé S, Antunes CM, Bavaro SL, Bouchaud G, Costa A, et al. Applying the adverse outcome pathway (AOP) for food sensitization to support *in vitro* testing strategies. *Trends Food Sci Technol*. 1 de marzo de 2019;85:307-19. doi:10.1016/j.tifs.2019.01.014
38. Pérez-Rodríguez L, Lozano-Ojalvo D, Menchén-Martínez D, Molina E, López-Fandiño R, Benedé S. Egg yolk lipids induce sensitization to egg white proteins in a mouse model without adjuvant and exacerbate Th2 responses to egg white in cells from allergic patients. *Food Res Int*. octubre de 2023;172:112669. doi:10.1016/j.foodres.2023.112669 PubMed PMID: 37689838.
39. 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*. 20 de marzo de 2020;12(3):831. doi:10.3390/nu12030831 PubMed PMID: 32245005; PubMed Central PMCID: PMC7146383.
40. Ko HJ, Hong SW, Verma R, Jung J, Lee M, Kim N, et al. Dietary Glucose Consumption Promotes RALDH Activity in Small Intestinal CD103+CD11b+ Dendritic Cells. *Front Immunol*. 2020;11:1897. doi:10.3389/fimmu.2020.01897 PubMed PMID: 32849649; PubMed Central PMCID: PMC7433714.
41. Nagata Y, Yamamoto T, Kadowaki M. Ginger Increases ALDH1A1 Expression and Enhances Retinoic Acid Signaling in a Human Colonic Epithelial Cell Line. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2020;66(5):462-7. doi:10.3177/jnsv.66.462 PubMed PMID: 33132350.
42. Lozano-Ojalvo D, Martínez-Blanco M, Pérez-Rodríguez L, Molina E, Peláez C, Requena T, et al. Egg white peptide-based immunotherapy enhances vitamin A metabolism and induces ROR γ t+ regulatory T cells. *J Funct Foods*. 1 de enero de 2019;52:204-11. doi:10.1016/j.jff.2018.11.012
43. Benedé S, Pérez-Rodríguez L, Molina E. Caco-2 Cell Response Induced by Peptides Released after Digestion of Heat-Treated Egg White Proteins. *Foods*. 9 de noviembre de 2022;11(22):3566. doi:10.3390/foods11223566 PubMed PMID: 36429158; PubMed Central PMCID: PMC9689089.
44. Ariffin JK, Sweet MJ. Differences in the repertoire, regulation and function of Toll-like Receptors and inflammasome-forming Nod-like Receptors between human and mouse. *Curr Opin Microbiol*. junio de 2013;16(3):303-10. doi:10.1016/j.mib.2013.03.002 PubMed PMID: 23540353.
45. Salazar F, Awuah D, Negm OH, Shakib F, Ghaemmaghani AM. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase-aryl hydrocarbon receptor pathway in the TLR4-induced tolerogenic phenotype in human DCs. *Sci Rep*. 3 de marzo de 2017;7:43337. doi:10.1038/srep43337 PubMed PMID: 28256612; PubMed Central PMCID: PMC5335671.
46. Zhao M, Zeng HT, Yang G, Geng XR, Zhang YY, Ma F, et al. Toll-like receptor signal is required in maintenance of immune suppressive capacity of regulatory T cells. *Immunol Lett*. 1 de junio de 2019;210:47-54. doi:10.1016/j.imlet.2019.04.005

47. Oda M, Yamamoto H, Kawakami T. Maintenance of homeostasis by TLR4 ligands. *Front Immunol.* 2024;15:1286270. doi:10.3389/fimmu.2024.1286270 PubMed PMID: 38715610; PubMed Central PMCID: PMC11074394.
48. Martínez-Blanco M, Lozano-Ojalvo D, Pérez-Rodríguez L, Benedé S, Molina E, López-Fandiño R. Retinoic Acid Induces Functionally Suppressive Foxp3+ROR γ t+ T Cells In Vitro. *Front Immunol.* 10 de agosto de 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.675733

ANEXOS

Anexo I. Análisis *in silico* de los criterios de adecuación para su verificación () de los primers seleccionados y diseñados. Parámetros obtenidos de Primer-BLAST y UCSC Genome Browser (University of California).

Cebador	Secuencia del cebador (5'-3')	LP ¹	PA ²	LC ³	GC ⁴	Tm ⁵	Referencia
IL13	D ⁶ AGACCAGACTCCCCTGTGCA	N/A ⁸	N/A	20	60,0	63,3	Sookrung y col., 2008
	R ⁷ TGGGTCCTGTAGATGGCATTG			21	52,3	63,1	
IL10.I	D TGTTCCTTTGGGGAGCCAACA	158	IL10	20	50,0	63,8	Li y col., 2018
	R GGGCTCCCTGGTTTCTCT			18	61,1	59,2	
IL10.II	D GTGATGCCCCAAGCTGAGA	138	IL10, SNTB1	19	57,8	62,4	Overbergh y col., 2003
	R CACGGCCTTGCTCTTGTTTT			20	50,0	62,6	
JAG2.I	D TCTCTGTGAGGTGGATGTCG	329	JAG2	20	55,0	59,8	Diseñado ⁹
	R GGCAGTCGTCAATGTTCTCA			20	50,0	59,8	
JAG2.II	D GTCAAGGTGGAGACGGTTGT	248	JAG2	20	55,0	60,0	Diseñado
	R TGGTAGAGCACGTCTTGTTG			20	55,0	59,9	
JAG2.III	D TCTGCCTTGCTACAATGGTG	166	JAG2	20	50,0	59,9	Diseñado
	R GCGATACCCGTTGATCTCAT			20	50,0	59,9	
ALDH 1A1.I	D GTTGTCAAACCAGCAGAGCA	115	ALDH1A1	20	50,0	60,0	Penumatsa y col., 2010
	R CTGTAGGCCCATTAACCAGGA			20	55,0	59,9	
ALDH 1A1.II	D TTACCTGTCCTACTCACCATT	164	ALDH1A1	22	45,4	57,8	Diseñado
	R GCCTTGTCACATCCTCCTTAT			22	45,4	59,5	
ALDH 1A1.III	D TCCTGGTTATGGGCCTACAG	N/A	N/A	20	55,0	59,9	Nautiyal y col., 2011
	R CAAGTCGGCATCAGCTAACA			20	50,0	60,0	
ALDH 1A2.I	D AGGAGATCTTTGGCCCTGTT	194	ALDH1A2	20	50,0	60,1	Diseñado
	RCTGGGCATTTAAGGCATTGT			20	45,0	60,0	
ALDH 1A2.II	D CCATTGGAGTGTGTGGACAG	152	ALDH1A2	20	55,0	60,0	Choi y col., 2019
	R GATGAGGGCTCCCATGTAGA			20	55,0	60,0	
ALDH 1A2.III	D CCTGTGGGCTCAATGAAAAACC	N/A	N/A	22	50,0	64,9	Kim y col., 2005
	R GAGGAGTTTGTGAGAAGAAGCGT			23	47,8	61,3	
GATA3.I	D GTTGGCCTAAGGTGGTTGTG	162	GATA3	20	55,0	60,4	Bonin y col., 2009
	R ATGCACGCTGGTAGCTCATA			20	50,0	59,5	
GATA3.II	D TGCTCGGAGGGTTTCTTGTT	140	GATA3	20	50,0	62,1	Li y col., 2014
	R ACGCTGGTAGCTCATACACT			20	50,0	55,1	
GATA3.III	D GTGCTGAGGGTAGCAGTGTA	115	GATA3	20	55,0	56,5	Pérez-Rodríguez y col., 2023
	R CTAACACAGAACACGACAGGG			21	52,3	58,3	

¹LP, longitud del amplicón (pares de bases); ²PA, producto de amplificación; ³LC, longitud del cebador (pares de bases); ⁴GC, contenido guanosa y citosina (%); ⁵Tm, temperatura melting (°C); ⁶D, cebador directo; ⁷R, cebador reverso; ⁸N/A, no aplica; ⁹Diseñado, pareja de cebadores generados y sintetizados en este trabajo.

Referencias bibliográficas del Anexo I

Sookrung N, Indrawattana N, Tungtrongchitr A, Karuhassuwan C, Chaisri U, Chaicumpa W. A murine model of allergy caused by American cockroach (CR), *Periplaneta americana*. Asian Pac J Allergy Immunol. 2008 Jun-Sep;26(2-3):143-9. PMID: 19054933.

Li, L., Yang, H., Li, Y. et al. Hypoxia restrains the expression of complement component 9 in tumor-associated macrophages promoting non-small cell lung cancer progression. *Cell Death Discovery* 4, 63 (2018).

Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne R, Bouillon R, Mathieu C. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech.* 2003 Mar;14(1):33-43. PMID: 12901609; PMCID: PMC2279895.

Penumatsa K, Edassery SL, Barua A, Bradaric MJ, Luborsky JL. Differential expression of aldehyde dehydrogenase 1a1 (ALDH1) in normal ovary and serous ovarian tumors. *J Ovarian Res.* 2010 Dec 22;3:28. doi: 10.1186/1757-2215-3-28. PMID: 21176222; PMCID: PMC3022900.

Nautiyal J, Kanwar SS, Yu Y, Majumdar AP. Combination of dasatinib and curcumin eliminates chemo-resistant colon cancer cells. *J Mol Signal.* 2011 Jul 20;6:7. doi: 10.1186/1750-2187-6-7. PMID: 21774804; PMCID: PMC3162943.

Choi JA, Kwon H, Cho H, Chung JY, Hewitt SM, Kim JH. ALDH1A2 Is a Candidate Tumor Suppressor Gene in Ovarian Cancer. *Cancers (Basel).* 2019 Oct 14;11(10):1553. doi: 10.3390/cancers11101553. PMID: 31615043; PMCID: PMC6826427.

Kim H, Lapointe J, Kaygusuz G, Ong DE, Li C, van de Rijn M, Brooks JD, Pollack JR. The retinoic acid synthesis gene ALDH1a2 is a candidate tumor suppressor in prostate cancer. *Cancer Res.* 2005 Sep 15;65(18):8118-24. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4562. PMID: 16166285.

Bonin F, Molina M, Malet C, Ginestet C, Berthier-Vergnes O, Martin MT, Lamartine J. GATA3 is a master regulator of the transcriptional response to low-dose ionizing radiation in human keratinocytes. *BMC Genomics.* 2009 Sep 7;10:417. doi: 10.1186/1471-2164-10-417. PMID: 19735555; PMCID: PMC2753551.

Li Y, Ishiguro H, Kawahara T, Miyamoto Y, Izumi K, Miyamoto H. GATA3 in the urinary bladder: suppression of neoplastic transformation and down-regulation by androgens. *Am J Cancer Res.* 2014 Sep 6;4(5):461-73. PMID: 25232488; PMCID: PMC4163611.

Pérez-Rodríguez L, Lozano-Ojalvo D, Menchén-Martínez D, Molina E, López-Fandiño R, Benedé S. Egg yolk lipids induce sensitization to egg white proteins in a mouse model without adjuvant and exacerbate Th2 responses to egg white in cells from allergic patients. *Food Res Int.* 2023 Oct;172:112669. doi: 10.1016/j.foodres.2023.112669. Epub 2023 Mar 9. PMID: 37689838.

Sookrung N, Indrawattana N, Tungtrongchitr A, Karuhassuwan C, Chaisri U, Chaicumpa W. A murine model of allergy caused by American cockroach (CR), *Periplaneta americana*. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2008 Jun-Sep;26(2-3):143-9. PMID: 19054933.

Anexo II. Secuencias de los cebadores utilizados para la evaluación de la expresión génica del gen de referencia *GAPDH* y de las alarminas *IL33*, *IL25* y *TSLP*.

Cebador	PA ¹	Secuencia del cebador (5'-3')	Referencia
GAPDH	<i>GAPDH</i>	D ² GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAA	Pérez-Rodríguez y col., 2023
		R ³ ACGTACTCAGCGCCAGCATC	
IL33	<i>IL33</i>	D GAGCTAAGGCCACTGAGGAA	Tordesillas y col., 2014
		R TGGGCCTTTGAAGTTCCATA	
IL25	<i>IL25</i>	D CCAGGTGGTTGCATTCTTGG	Wang y col., 2007
		R TGGCTGTAGGTGTGGGTTCC	
TSLP	<i>TSLP</i>	D CTCTGGAGCATCAGGGAGAC	Pérez-Rodríguez y col., 2023
		R CAATTCCACCCAGTTTCAC	

¹PA, producto de amplificación; ²D, cebador directo; ³R, cebador reverso.

Referencias bibliográficas del Anexo II

Tordesillas L, Goswami R, Benedé S, Grishina G, Dunkin D, Järvinen KM, Maleki SJ, Sampson HA, Berin MC. Skin exposure promotes a Th2-dependent sensitization to peanut allergens. *J Clin Invest.* 2014 Nov;124(11):4965-75. doi: 10.1172/JCI75660. Epub 2014 Oct 8. PMID: 25295541; PMCID: PMC4347216.

Pérez-Rodríguez L, Lozano-Ojalvo D, Menchén-Martínez D, Molina E, López-Fandiño R, Benedé S. Egg yolk lipids induce sensitization to egg white proteins in a mouse model without adjuvant and exacerbate Th2 responses to egg white in cells from allergic patients. *Food Res Int.* 2023 Oct;172:112669. doi: 10.1016/j.foodres.2023.112669. Epub 2023 Mar 9. PMID: 37689838.

Wang YH, Angkasekwinai P, Lu N, Voo KS, Arima K, Hanabuchi S, Hippe A, Corrigan CJ, Dong C, Homey B, Yao Z, Ying S, Huston DP, Liu YJ. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med.* 2007 Aug 6;204(8):1837-47. doi: 10.1084/jem.20070406. Epub 2007 Jul 16. PMID: 17635955; PMCID: PMC2118667.

Anexo III. Evaluación de la calidad y concentración del RNA y del cDNA obtenidos a partir de células Caco-2 cultivadas en sistemas Transwell cocultivadas con PBMCs estimuladas bajo las distintas condiciones descritas. Se muestran las muestras, las relaciones de absorbancia a 260/280 ($A_{260/280}$) y 260/230 ($A_{260/230}$), así como la concentración de DNA complementario (cDNA) y RNA determinada mediante Nanodrop (ThermoFisher Scientific, Waltham, EE. UU).

	RNA extraído			cDNA sintetizado		
Muestra	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	RNA (ng/ μ L)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	cDNA (ng/ μ L)
CTRL 1	2,08	2,09	101,0	1,79	1,91	701,3
CTRL 2	2,08	2,10	88,3	1,78	1,93	740,7
LPS 1	2,06	2,01	99,9	1,80	1,88	619,9
LPS 2	2,06	2,01	88,3	1,79	1,92	713,1
LPS 3	2,08	2,14	87,8	1,79	1,91	681,0
RA 1	2,07	2,16	128,9	1,79	1,96	758,5
RA 2	2,11	2,18	73,7	1,78	1,93	685,8
RA 3	2,04	1,93	71,8	1,79	1,90	630,5
OVA 1	2,07	1,92	92,1	1,80	1,93	643,8
OVA 2	2,07	2,07	80,5	1,79	1,94	656,8
OVA 3	2,09	1,97	80,7	1,78	1,95	695,0
OP20 1	2,1	1,81	34,9	1,76	2,14	881,7
OP20 2	2,1	1,95	66,3	1,78	2,05	730,5
OP20 3	2,05	1,75	44,2	1,76	2,02	677,8
OP200 1	2,05	2,11	93,0	1,78	1,99	709,8
OP200 2	2,13	2,04	50,2	1,59	1,24	421,0
OP200 3	2,06	1,29	70,2	1,77	1,94	731,7