

“Nuevas estrategias de monitorización de intervención con biológicos”

Dr. Domingo Barber, Dra. María Escribese.

Facultad de Medicina. Departamento de Ciencias Medicas Básicas. Universidad CEU San Pablo.

Introducción

La alergia es la cuarta enfermedad no trasmisible más prevalente a nivel mundial. Se estima que hasta 150 millones de ciudadanos europeos sufrirán algún tipo de alergia durante esta década. En paralelo a este incremento, cada vez más pacientes alérgicos sufren de algún tipo de alergia grave, respiratoria, cutánea a medicamentos o alimentaria. Mientras que la sintomatología de pacientes alérgicos leves se controla mayoritariamente en medicina primaria con fármacos, normalmente genéricos de coste relativamente bajo, los pacientes afectados de patologías graves son tratados con un número creciente de nuevos medicamentos biológicos, que compiten por un posicionamiento prioritario en las distintas patologías alérgicas graves. Su uso viene determinado por biomarcadores sistémicos (IgE total, número de eosinófilos, score de gravedad...) y muy frecuentemente se deben ensayar sucesivamente distintos medicamentos biológicos para conseguir controlar la enfermedad de un paciente.

MERCADO BIOLÓGICOS EN ALERGIA 2021

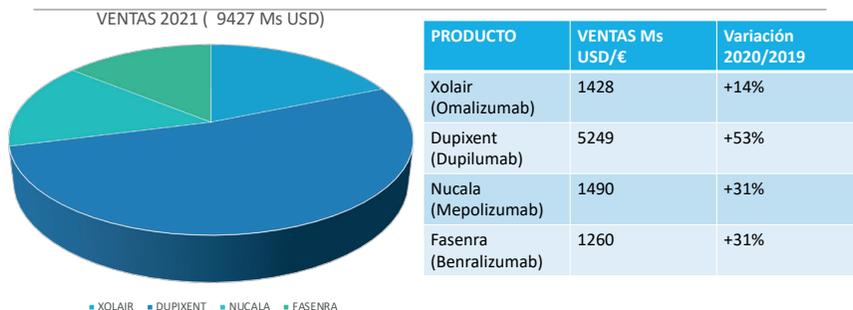
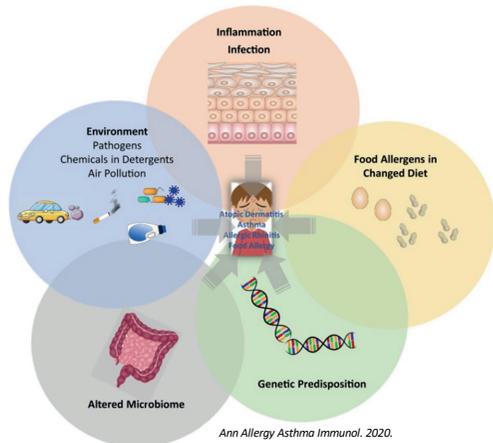


Figura 1: Mercado mundial en 2021 de medicamentos biológicos en alergia.



La incorporación creciente de estos medicamentos ha potenciado la competencia entre ellos y la extensión creciente de uso. En los últimos años, el crecimiento del mercado de biológicos ha disparado el gasto farmacéutico. Cada vez es más evidente que hay que potenciar el uso racional de estos medicamentos y priorizar estrategias de prevención y reversión de la enfermedad.

El uso generalizado de estos productos, ha impactado las guías de práctica clínica, cada vez más enfocadas en el control de la enfermedad. En este contexto la aproximación etiológica en el manejo de la enfermedad alérgica ha ido perdiendo relevancia por distintos motivos. El control de los pacientes leves desde primaria, ha tenido como consecuencia, la no derivación al especialista, potenciada desde los organismos públicos que promueven la menor derivación hospitalaria. Las compañías farmacéuticas comercializadoras de medicamentos biológicos, prefieren evitar diagnósticos etiológicos complejos y orientan



preferentemente del diseño de sus productos ligados a marcadores simples no específicos y orientados al órgano principalmente afectado por la enfermedad alérgica; vía respiratoria alta o baja, piel, .. Por último, el desconocimiento de los mecanismos implicados en la intervención etiológica ha derivado en una utilización subóptima de la inmunoterapia alérgeno específica (AIT). Asimismo, concepciones mecanísticas basadas en hipótesis erróneas ha derivado en múltiples ensayos clínicos fallidos y ha desincentivado la inversión en nuevos productos de inmunoterapia y provocado la salida progresiva de empresas farmacéuticas de este sector.

Agache, L., *Allergy* (2019)
 Cecchi, L., *J Allergy Clin Immunol* (2018)
 Vriegheid, M., *Thorax* (2014)

Figura 2: La enfermedad alérgica es una patología sistémica que debe abordarse globalmente con estrategias orientadas a prevención, reversión y modificación de la misma.

Si la alergia es una enfermedad sistémica, deberíamos de disponer de marcadores sistémicos de la enfermedad. Dichos marcadores nos indicarían el estado del paciente y deberían servir para valorar y sobre todo comparar las distintas estrategias de intervención en la enfermedad y demostrar el valor de la aproximación etiológica.

La biología de sistemas, permite valorar simultáneamente miles de variables a múltiples niveles (ciencias ómicas) y entender los perfiles subyacentes a un estado patológico. Además, facilita la identificación de nuevos biomarcadores potenciales para monitorizar el estado de un paciente. Esta aproximación es clave para el desarrollo de la medicina personalizada.

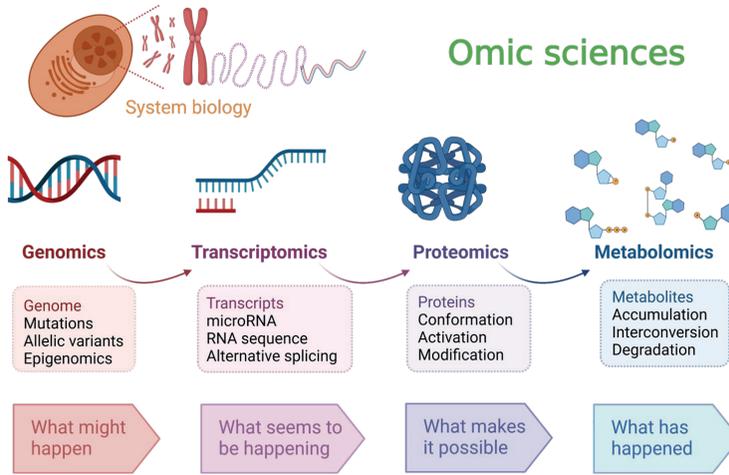


Figura 3: Resumen de las ciencias ómicas, base de la aproximación de biología de sistemas en el diagnóstico y manejo de las patologías.

En los últimos años diversos estudios colaborativos, incluyendo miles de pacientes han abordado aproximaciones ómicas para buscar nuevos biomarcadores y entender los procesos de la enfermedad. Sin embargo, los resultados no han cumplido con las expectativas generadas. Las razones de este fracaso relativo pueden deberse a distintos factores. Por un lado, la estratificación clínica de los pacientes es compleja y en estudios multicéntricos va a ser fuente de gran variabilidad. Por otro lado, frecuentemente los pacientes están fuertemente medicados y con gran variabilidad en la aproximación farmacológica, lo que interfiere las distintas rutas biológicas ligadas a la enfermedad. Por último, la alergia grave, generalmente está asociada a otras morbilidades que contribuirán al desarrollo de la patología y serán fuente de variabilidad adicional y hacen difícil un acuerdo en los criterios de gravedad de la enfermedad.

Hace aproximadamente diez años, iniciamos una aproximación diferente orientada a identificar posibles biomarcadores ligados a fenotipos graves con el objetivo de mejorar las estrategias de intervención y probar la relevancia de la aproximación etiológica en alergia.

MODELOS DE GRAVEDAD EN ALERGIA

Si la alergia es una enfermedad sistémica debe haber un solapamiento de los sistemas biológicos en distintos modelos de gravedad. Los criterios de gravedad, no pueden basarse únicamente en un tipo de patología, por ejemplo asma, donde distintos factores (genéticos, epigenéticos, exposoma, infecciones víricas en infancia, ...) desempeñan un papel crítico no ligado necesariamente al nivel de alergia.



La aproximación seguida es utilizar modelos de gravedad muy bien definidos, controlar la homogeneidad de los criterios clínicos de inclusión, realizar los estudios con grupos clínicos con gran experiencia en el manejo de estos pacientes, frecuentemente con historial de seguimiento a lo largo de décadas y estrategias de tratamiento homogéneas.

En cada modelo se han seguido estrategias complementarias de análisis de biología de sistemas. Las rutas y sistemas detectados se han validado en estudios funcionales y se ha realizado una revisión exhaustiva de los sistemas biológicos identificados. En varios casos estos sistemas se han descrito por primera vez en alergia.

Fenotipos alérgicos graves estudiados

- 1) Pacientes de Extremadura, sensibilizados a gramíneas con profilina positiva y reacciones alimentarias graves mediadas por profilina. Mala respuesta a AIT
- 2) Pacientes de Córdoba, sensibilizados a Ole e 7 y clínica no controlada. Mala respuesta a AIT
- 3) Pacientes de Canarias, asma no controlado por ácaros, frecuentes reacciones con harinas contaminadas por ácaros en ausencia de sensibilización a alérgenos alimentarios. No responden a AIT
- 4) Pacientes de Madrid, de muy difícil control. Frecuentemente poli sensibilizados y con asma. No responden a AIT
- 5) Pacientes de Valencia que ingresan en urgencias con reacciones anafilácticas

Figura 4: Resumen de los modelos utilizados en la generación de nuevas estrategias de biomarcadores en alergia.

SISTEMAS IDENTIFICADOS

El análisis de los datos obtenidos de los distintos modelos de gravedad, han permitido identificar hasta siete sistemas biológicos afectados a nivel sistémico en pacientes graves. Estos sistemas, que se describen en la figura 5, están alterados a nivel sistémico en los pacientes graves, pero frecuentemente no presentan alteración o esta es poco significativa en sujetos alérgicos leves o moderados, o en sujetos fuertemente medicados. Los sistemas biológicos identificados están descritos en profundidad en distintas revisiones en la parte de bibliografía. De igual modo, las publicaciones originales de los distintos sistemas están incluidas en el apartado correspondiente de la bibliografía.

SISTEMAS ASOCIADOS AL FENOTIPO GRAVE	
1	Alteración del metabolismo ENERGETICO
2	Alteración del metabolismo de ESFINGOLIPIDOS : Sphingosine -1-P
3	Alteración del metabolismo de FOSFOLIPIDOS : Lisofosfolipidos
4	REMODELADO de barrera oral en ausencia de exposición
5	PROLIFERACION y activación de células T
6	Daño en la respuesta T REGULADORA
7	Función PLAQUETARIA alterada

Figura 5: Sistemas biológicos identificados en pacientes alérgicos graves.

Aunque no es el objetivo de esta presentación los resultados de estos trabajos apuntan que para que una enfermedad alérgica este controlada, debe haber un fino equilibrio entre la respuesta efectora, la respuesta reguladora y la respuesta reparadora. Estas tres respuestas actúan desde el principio de forma coordinada y permiten mantener la respuesta alérgica controlada. En este equilibrio la señalización de esfingolípidos y las plaquetas juegan un papel relevante, que hasta ahora no había sido identificado. Es interesante señalar que un polimorfismo genético en el sistema de biosíntesis de esfingolípidos (17q21) es de las mutaciones con mayor asociación a asma, lo que sugiere que la S1P (esfingosina 1 fosfato) juega un papel clave en la señalización inflamatoria y reparadora. Es interesante reseñar, que la S1P se encuentra presente en cantidades significativas en las plaquetas, que actúan como reservorio del metabolito.

A medida que progresa la inflamación, y asociada bien a exposición permanente intensa, bien a exposición intensa estacional y estimulación permanente de células T (por ejemplo por exposición a panalérgenos [profilinas, LTP, ...]) se produce un estado de proliferación elevado, marcado por un metabolismo energético alterado, una afectación de la integridad de las barreras, una infiltración de linfocitos T y un aumento de la sensibilidad de células efectoras. El agotamiento o fallo de la respuesta reguladora, lleva asimismo aparejado un fracaso del sistema de reparación e inicia lo que conocemos como procesos de remodelado y desarrollo a una respuesta TH17.

En la figura 6, se presenta un resumen esquemático de los hallazgos principales del fenotipado de la respuesta T en pacientes con alergia grave a polen de olivo que ilustra el fallo de la respuesta reguladora.

El primer modelo de gravedad de alergia a gramíneas, identifico señales ligadas a alteración de la función plaquetaria. Recientemente hemos podido validar dicha alteración en un modelo clínico que se basa en una estratificación en base a la gravedad clínica, no a

un modelo extremo de exposición. Los sujetos alérgicos residentes en Madrid, presentan un difícil control a menudo están polisensibilizados y han presentado una mala evolución y respuesta a intervención. Es importante señalar que las investigaciones realizadas identifican mecanismos subyacentes comunes en modelos de gravedad clínica muy diferente y por lo tanto avalan una aproximación integral y no orgánica de la patología alérgica.

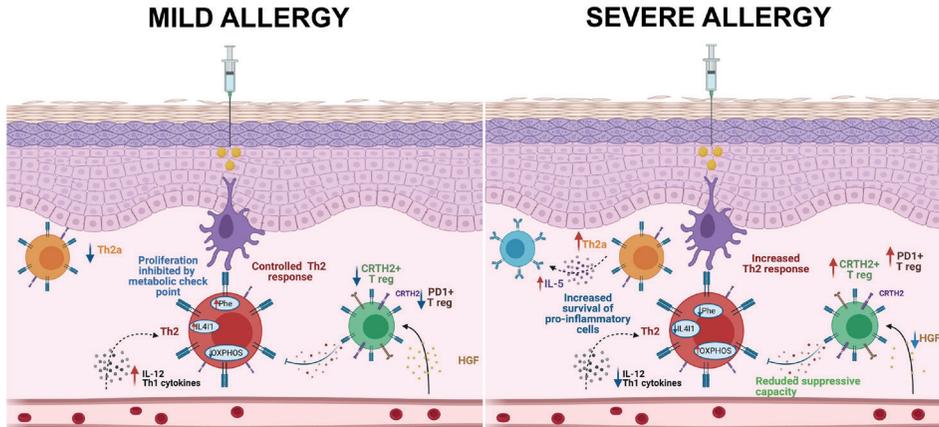


Figura 6: Los pacientes de fenotipo grave presentan signos de agotamiento o de fallo de la respuesta reguladora y de una respuesta efectora altamente proinflamatoria.

NUEVAS ESTRATEGIAS DE BIOMARCADORES

En base a los estudios anteriores, se seleccionó un panel de biomarcadores metabólicos asociados a perfiles de alergia grave. (Figura 7)

El conjunto de biomarcadores es representativo de los distintos sistemas y rutas implicados en la inflamación y tiene un uso potencial para estratificar y clasificar pacientes en función de la gravedad de la enfermedad y para estudiar el efecto de las distintas intervenciones en alergia a nivel sistémico. De esta manera podremos correlacionar la evolución o respuesta clínica a la intervención con los biomarcadores. Actualmente, el posible valor para estratificar pacientes alérgicos se está estudiando en el proyecto BIOGRIAL. Biogrial es un proyecto coordinado con tres proyectos, financiado por el ISCIII, que pretende incluir 1600 pacientes con distintos niveles de gravedad a distintas patologías alérgicas, y que está en avanzado plazo de ejecución.

METODO DE METABOLIMICA DIRIGIDA EN INFLAMACION ALERGICA



Type of the Paper (Article)

Development of a Novel Targeted Metabolomic LC-MRM/MS Method on Allergic Inflammation

David Obeso ^{1,2*}, Nuria Contreras ^{1,2*}, Mariana Dolores-Hernández ^{1,3}, Coral Barbas ², María Marta Escríbese ¹, Domingo Barber ¹ and Alma Villaseñor ^{1*}

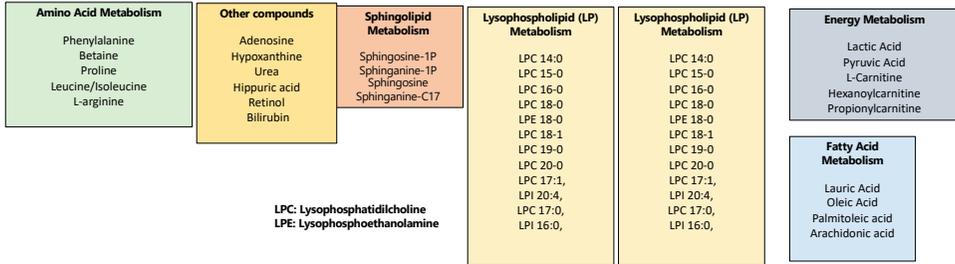


Figura 7: Biomarcadores metabólicos usados para desarrollar y validar un método de metabolómica en inflamación alérgica.

Como complemento a este método, el desarrollo en los últimos años de nuevos métodos de proteómica ha hecho posible disponer de métodos fiables y muy sensibles, que permiten cuantificar marcadores proteicos de inflamación. (Figura 8)

La aplicación conjunta de ambos métodos, nos permite entender el efecto a nivel de sistemas de los distintos tipos de intervención en general y de medicamentos biológicos en particular.

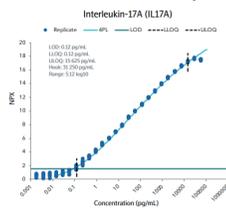


Olink Target 48: Cuantificación absoluta

Olink Target Cytokine

- Absolute quantification in pg/ml (5 unidades logarítmicas)

- Simultaneous analysis of 45 protein biomarkers



- Calibrator curves from IL17A assay

Other

- Hepatocyte growth factor (HGF)
- Interstitial collagenase (MMP1)
- Macrophage metalloelastase (MMP12)
- Oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (OLR1)
- Pro-epidermal growth factor (EGF)
- Protransforming growth factor alpha (TGFα)
- Vascular endothelial growth factor A (VEGFA)

Cytokines

- Fms-related tyrosine kinase 3 ligand (FLT3LG)
- Granulocyte colony-stimulating factor (CSF3)
- Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF2)
- Interferon gamma (IFNG)
- Interleukin-1 beta (IL1B)
- Interleukin-2 (IL2)
- Interleukin-4 (IL4)
- Interleukin-6 (IL6)
- Interleukin-7 (IL7)
- Interleukin-8 (CXCL8)
- Interleukin-10 (IL10)
- Interleukin-13 (IL13)
- Interleukin-15 (IL15)
- Interleukin-17A (IL17A)
- Interleukin-17C (IL17C)
- Interleukin-17F (IL17F)
- Interleukin-18 (IL18)
- Interleukin-27 (IL27)
- Interleukin-33 (IL33)
- Lymphotxin-alpha (LTA)
- Macrophage colony-stimulating factor 1 (CSF1)
- Oncostatin-M (OSM)
- Tumor necrosis factor (TNF)
- Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10 (TNFSF10)
- Thyctic stromal lymphopoietin (TSLP)
- Tumor necrosis factor ligand superfamily member 12 (TNFSF12)

Chemokines

- C-C motif chemokine 2 (CCL2)
- C-C motif chemokine 3 (CCL3)
- C-C motif chemokine 4 (CCL4)
- C-C motif chemokine 7 (CCL7)
- C-C motif chemokine 8 (CCL8)
- C-C motif chemokine 13 (CCL13)
- C-C motif chemokine 19 (CCL19)
- C-X-C motif chemokine 9 (CXCL9)
- C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10)
- C-X-C motif chemokine 11 (CXCL11)
- Eotaxin (CCL11)
- Stromal cell-derived factor 1 (CXCL12)

Figura 8: Metodología OLINK de cuantificación absoluta de citocinas en suero.



EFFECTO DE LA INTERVENCIÓN CON OMALIZUMAB Y MEPOLIZUMAB EN ASMA

La monitorización a lo largo del tiempo de distintos tipos de intervención con medicamentos biológicos permite validar la viabilidad de los nuevos biomarcadores en el seguimiento del tratamiento.

Es interesante reseñar, que los dos productos biológicos estudiados, presentan una distinta señalización, tanto en la intensidad de las modificaciones producidas, como en las rutas biológicas afectadas.

Estos resultados preliminares deberán completarse con series mayores de pacientes y los nuevos biológicos introducidos después de la ejecución del proyecto, pero avalan que la biología de sistemas es una herramienta útil para descubrir nuevas estrategias diagnósticas.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

La utilización de modelos de gravedad de enfermedades alérgicas ha probado ser una estrategia clave para identificar distintos sistemas biológicos nuevos implicados en la evolución a gravedad de la enfermedad alérgica. El análisis de patrones moleculares de dichos modelos ha permitido la identificación de nuevos biomarcadores y el desarrollo de nuevos métodos de estratificación y seguimiento de intervención en alergia. La aplicación a los distintos tipos de intervención permitirá validar que las estrategias de prevención y modificación de la enfermedad ofrecen un valor diferencial de abordaje de la patología y avalará que el paciente alérgico debe ser evaluado de forma global por especialistas cualificados.

Bibliografía

1. Barber D, Villaseñor A, Escribese MM. Metabolomics strategies to discover new biomarkers associated to severe allergic phenotypes. *Asia Pac Allergy*. 2019 Oct 28;9(4):e37. doi: 10.5415/apallergy.2019.9.e37. PMID: 31720248; PMCID: PMC6826109.
2. Barker-Tejeda TC, Bazire R, Obeso D, Mera-Berriatua L, Rosace D, Vazquez- Cortes S, Ramos T, Rico MDP, Chivato T, Barbas C, Villaseñor A, Escribese MM, Fernández-Rivas M, Blanco C, Barber D. Exploring novel systemic biomarker approaches in grass-pollen sublingual immunotherapy using omics. *Allergy*. 2021 Apr;76(4):1199-1212. doi: 10.1111/all.14565. Epub 2020 Sep 22. PMID: 32813887; PMCID: PMC8246889.
3. Delgado Dolset MI, Obeso D, Rodríguez-Coira J, Villaseñor A, González Cuervo H, Arjona A, Barbas C, Barber D, Carrillo T, Escribese MM. Contribution of allergy in the acquisition of uncontrolled severe asthma. *Front Med (Lausanne)*. 2022 Sep 21;9:1009324. doi: 10.3389/fmed.2022.1009324. PMID: 36213665; PMCID: PMC9532527.
4. Delgado-Dolset MI, Obeso D, Rodríguez-Coira J, Tarin C, Tan G, Cumplido JA, Cabrera A, Angulo S, Barbas C, Sokolowska M, Barber D, Carrillo T, Villaseñor A, Escribese MM. Understanding uncontrolled severe allergic asthma by integration of omic and clinical data. *Allergy*. 2022 Jun;77(6):1772-1785. doi: 10.1111/all.15192. Epub 2021 Dec 9. PMID: 34839541.
5. Delgado-Dolset MI, Obeso D, Sánchez-Solares J, Mera-Berriatua L, Fernández P, Barbas C, Fresnillo M, Chivato T, Barber D, Escribese MM, Villaseñor A. Understanding Systemic and Local Inflammation Induced by Nasal Polyposis: Role of the Allergic Phenotype. *Front Mol Biosci*. 2021 May 14;8:662792. doi: 10.3389/fmolb.2021.662792. PMID: 34055883; PMCID: PMC8160224.
6. Díaz-Perales A, Escribese MM, Garrido-Arandia M, Obeso D, Izquierdo-Alvarez E, Tome-Amat J, Barber D. The Role of Sphingolipids in Allergic Disorders. *Front Allergy*. 2021 Jun 14;2:675557. doi: 10.3389/falgy.2021.675557. PMID: 35386967; PMCID: PMC8974723.
7. Eguiluz-Gracia I, Tay TR, Hew M, Escribese MM, Barber D, O'Hehir RE, Torres MJ. Recent developments and highlights in biomarkers in allergic diseases and asthma. *Allergy*. 2018 Dec;73(12):2290-2305. doi: 10.1111/all.13628. Epub 2018 Oct 30. PMID: 30289997.
8. Gomez-Casado C, Sanchez-Solares J, Izquierdo E, Díaz-Perales A, Barber D, Escribese MM. Oral Mucosa as a Potential Site for Diagnosis and Treatment of Allergic and Autoimmune Diseases. *Foods*. 2021 Apr 28;10(5):970. doi: 10.3390/foods10050970. PMID: 33925074; PMCID: PMC8146604.
9. Gomez-Casado C, Villaseñor A, Rodríguez-Nogales A, Bueno JL, Barber D, Escribese MM. Understanding Platelets in Infectious and Allergic Lung Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019 Apr 8;20(7):1730. doi: 10.3390/ijms20071730. PMID: 30965568; PMCID: PMC6480134.
10. Karaaslan C, Mayorga C, Baerenfaller K, Escribese MM. Editorial: Systems Biology Approach to the Immunology of Asthma and Allergy. *Front Immunol*. 2022 Feb 14;13:857403. doi: 10.3389/fimmu.2022.857403. PMID: 35237280; PMCID: PMC8884530.
11. López-Rodríguez JC, Rodríguez-Coira J, Benedé S, Barbas C, Barber D, Villalba MT, Escribese MM, Villaseñor A, Batanero E. Comparative metabolomics analysis of bronchial epithelium during barrier establishment after allergen exposure. *Clin Transl Allergy*. 2021 Sep;11(7):e12051. doi: 10.1002/ct2.12051. PMID: 34582104; PMCID: PMC9082991.
12. Obeso D, Contreras N, Dolores-Hernández M, Carrillo T, Barbas C, Escribese MM, Villaseñor A, Barber D. Development of a Novel Targeted Metabolomic LC-QqQ- MS Method in Allergic Inflammation. *Metabolites*. 2022 Jun 25;12(7):592. doi: 10.3390/metabo12070592. PMID: 35888716; PMCID: PMC9319984.



13. Obeso D, Mera-Berriatua L, Rodríguez-Coira J, Rosace D, Fernández P, Martín- Antoniano IA, Santaolalla M, Marco Martín G, Chivato T, Fernández-Rivas M, Ramos T, Blanco C, Alvarado MI, Domínguez C, Angulo S, Barbas C, Barber D, Villaseñor A, Escribese MM. Multi-omics analysis points to altered platelet functions in severe food-associated respiratory allergy. *Allergy*. 2018 Nov;73(11):2137-2149. doi: 10.1111/all.13563. Epub 2018 Aug 9. PMID: 30028518.
14. Pablo-Torres C, Delgado-Dolset MI, Sanchez-Solares J, Mera-Berriatua L, Núñez Martín Buitrago L, Reaño Martos M, Bueno JL, Escribese MM, Barber D, Gomez- Casado C. A method based on plateletpheresis to obtain functional platelet, CD3+ and CD14+ matched populations for research immunological studies. *Clin Exp Allergy*. 2022 Oct;52(10):1157-1168. doi: 10.1111/cea.14192. Epub 2022 Jul 16. PMID: 35757844; PMCID: PMC9796013.
15. Pascal M, Perez-Gordo M, Caballero T, Escribese MM, Lopez Longo MN, Luengo O, Manso L, Matheu V, Seoane E, Zamorano M, Labrador M, Mayorga C. Microbiome and Allergic Diseases. *Front Immunol*. 2018 Jul 17;9:1584. doi: 10.3389/fimmu.2018.01584. PMID: 30065721; PMCID: PMC6056614.
16. Radzikowska U, Baerenfaller K, Cornejo-Garcia JA, Karaaslan C, Barletta E, Sarac BE, Zhakparov D, Villaseñor A, Eguiluz-Gracia I, Mayorga C, Sokolowska M, Barbas C, Barber D, Ollert M, Chivato T, Agache I, Escribese MM. Omics technologies in allergy and asthma research: An EAACI position paper. *Allergy*. 2022 Oct;77(10):2888-2908. doi: 10.1111/all.15412. Epub 2022 Jun 30. PMID: 35713644; PMCID: PMC9796060.
17. Rodríguez-Coira J, Delgado-Dolset MI, Obeso D, Dolores-Hernández M, Quintás G, Angulo S, Barber D, Carrillo T, Escribese MM, Villaseñor A. Troubleshooting in Large-Scale LC-ToF-MS Metabolomics Analysis: Solving Complex Issues in Big Cohorts. *Metabolites*. 2019 Oct 24;9(11):247. doi: 10.3390/metabo9110247. PMID: 31652940; PMCID: PMC6918290.
18. Rosace D, Gomez-Casado C, Fernandez P, Perez-Gordo M, Dominguez MDC, Vega A, Belver MT, Ramos T, Vega F, Marco G, de Pedro M, Sanchez L, Arnas MLM, Santaolalla M, Saez MÁ, Benedé S, Fernandez-Rivas M, Blanco C, Alvarado MI, Escribese MM, Barber D. Profilin-mediated food-induced allergic reactions are associated with oral epithelial remodeling. *J Allergy Clin Immunol*. 2019 Feb;143(2):681-690.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2018.03.013. Epub 2018 Apr 27. PMID: 29705246.
19. Sanchez-Solares J, Delgado-Dolset MI, Mera-Berriatua L, Hormias-Martin G, Cumplido JA, Saiz V, Carrillo T, Moreno-Aguilar C, Escribese MM, Gomez-Casado C, Barber D. Respiratory allergies with no associated food allergy disrupt oral mucosa integrity. *Allergy*. 2019 Nov;74(11):2261-2265. doi: 10.1111/all.13860. Epub 2019 Jul 9. PMID: 31077403.
20. Varona R, Ramos T, Escribese MM, Jimeno L, Galán A, Würtzen PA, Vega F, Marín A, Martín S, Carrera AC, Blanco C, Barber D. Persistent regulatory T-cell response 2 years after 3 years of grass tablet SLIT: Links to reduced eosinophil counts, sIgE levels, and clinical benefit. *Allergy*. 2019 Feb;74(2):349-360. doi: 10.1111/all.13553. Epub 2018 Oct 11. PMID: 30003552; PMCID: PMC6585999.
21. Villaseñor A, Eguiluz-Gracia I, Moreira A, Wheelock CE, Escribese MM. Metabolomics in the Identification of Biomarkers of Asthma. *Metabolites*. 2021 May 29;11(6):346. doi: 10.3390/metabo11060346. PMID: 34072459; PMCID: PMC8227545.
22. Villaseñor A, Rosace D, Obeso D, Pérez-Gordo M, Chivato T, Barbas C, Barber D, Escribese MM. Allergic asthma: an overview of metabolomic strategies leading to the identification of biomarkers in the field. *Clin Exp Allergy*. 2017 Apr;47(4):442-456. doi: 10.1111/cea.12902. PMID: 28160515.