

## “YRNA y alergia: regulación epigenética y enfermedades alérgicas, nuevas perspectivas”.

Miguel Estravís<sup>1, 2, 3</sup>, Asunción García-Sánchez<sup>1, 2, 3</sup>, Catalina Sanz<sup>2, 3, 4</sup>, Ignacio Dávila<sup>1, 2, 3, 5</sup>, María Isidoro<sup>2, 3, 6, 7</sup>

<sup>1)</sup> *Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico, Universidad de Salamanca*

<sup>2)</sup> *Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca*

<sup>3)</sup> *RETICS Asma, Reacciones Adversas y Alérgicas (ARADyAL) de Instituto de Salud Carlos III, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca*

<sup>4)</sup> *Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca*

<sup>5)</sup> *Servicio de Inmunoalergia, Hospital Universitario de Salamanca*

<sup>6)</sup> *Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca*

<sup>7)</sup> *Servicio de Bioquímica Clínica. Hospital Universitario de Salamanca*

## Introducción

En las últimas décadas las enfermedades de tipo alérgico, como la rinoconjuntivitis, el asma, la dermatitis atópica, la anafilaxia y la alergia alimentaria, entre otras, han emergido como uno de los grandes problemas de salud en los países desarrollados<sup>1,2</sup>. Esta escalada en la incidencia de dichas enfermedades ha motivado un creciente interés por el estudio de los mecanismos moleculares y genéticos que desembocan en la aparición de estas enfermedades. El aumento en la incidencia de enfermedades alérgicas en los países occidentales ha ido acompañado de cambios significativos en el estilo de vida, como cambios en los hábitos nutricionales, en la exposición a patógenos y a agentes contaminantes, el tabaquismo, la reducción de los núcleos familiares, y el aumento en el uso de antibióticos, que apoyan la hipótesis de la higiene como una posible explicación al incremento de las enfermedades alérgicas<sup>3,4</sup>.

Durante años, se han buscado factores de riesgo que permitieran predecir la predisposición a padecer una enfermedad de tipo alérgico. Además de los factores ambientales, se han buscado factores de origen genético (presentes en la secuencia del ADN y transmisibles de una generación a la siguiente) mediante estudios de asociación genómicos<sup>5-8</sup>. Sin embargo, se ha observado plasticidad en los fenotipos asociados a un determinado genotipo. Incluso la valiosa información obtenida de estudios realizados con gemelos monocigóticos apunta a que, a pesar de compartir la misma secuencia de ADN, las manifestaciones clínicas de la alergia pueden ser muy dispares<sup>9</sup>.

Esta variedad en los fenotipos potenciales para un mismo genotipo indica que parecen existir componentes adicionales que aportan complejidad a la regulación de los procesos que desembocan en la aparición de la enfermedad alérgica, o que al menos, condicionan su evolución a lo largo del tiempo<sup>10,11</sup>. La regulación epigenética ha emergido como la gran pieza que faltaba en el puzle para empezar a comprender las bases moleculares de las enfermedades alérgicas<sup>12</sup>.

En los últimos años, se ha puesto el foco sobre las modificaciones epigenéticas que conducen a la aparición de las enfermedades alérgicas o aquellas presentes en pacientes alérgicos. Cuando en 1953, Conrad Waddington acuñó el término epigenética lo definió como “la forma en que los genotipos dan lugar a los fenotipos durante el desarrollo”<sup>13</sup>, desde entonces, se ha tenido que actualizar el término, que ya ha traspasado los límites de la biología del desarrollo e incluido nuevos mecanismos epigenéticos entonces desconocidos<sup>14</sup>. De esta forma, actualmente se conoce como epigenética al compendio de cambios de la célula que afectan a la expresión de genes sin modificar la secuencia de bases del ADN. Estos cambios se producen en respuesta a señales internas o externas y son susceptibles de ser heredados<sup>15-18</sup>. Entre los mecanismos epigenéticos, algunos afectan a la estructura de la cromatina, modificando la expresión génica, otros afectan a la estructura y estabilidad de distintos tipos de ARN, y otros dan lugar a diferentes ARN no codificantes que influyen en los procesos postranscripcionales y traduccionales de los genes.

Las modificaciones epigenéticas se han clasificado principalmente en tres grupos, en función del tipo de mecanismo que regule el cambio. Para una mejor comprensión lectora, las diferentes modificaciones epigenéticas se agruparán en: 1) metilación del ADN, 2) modificaciones postraduccionales de las histonas y 3) mecanismos dependientes de ARN no codificantes (Tabla I). Además, se ha puesto recientemente de manifiesto la relevancia de las modificaciones postranscripcionales, ya que modificaciones como la metilación de adeninas ejercen un efecto importante sobre la estabilidad y funcionalidad de los ARN<sup>19</sup>. Por este motivo ya se ha acuñado el término epitranscriptómica para el estudio de dichas modificaciones<sup>20</sup>.

## Metilación del ADN

La metilación del ADN es la modificación epigenética más ampliamente estudiada, y consiste en la adición de un grupo metilo en las citosinas o las adeninas del ADN. Esta modificación química no implica la alteración de la secuencia de bases del ADN. Cuando estas metilaciones ocurren en el nucleótido citosina, dan lugar a 5-metil-2'-desoxicitosina, mientras que cuando lo hacen en el nucleótido adenina dan lugar a N6-metil-2'-desoxiadenosina<sup>21</sup>. La metilación de la citosina en el ADN humano ha sido ampliamente estudiada durante las últimas décadas<sup>22</sup>, mientras que la presencia de N6-metil-2'-desoxiadenosina no ha sido corroborada en células humanas hasta esta última década y todavía no está definida su función en el desarrollo embrionario y en otras patologías en las que se han detectado modificaciones en los niveles de metilación de desoxiadenosina<sup>23-26</sup>.

Con respecto a la metilación de la citosina, no todas las citosinas del genoma son susceptibles de ser metiladas, esta modificación sólo ocurre en dinucleótidos CpG. Las zonas ricas en dinucleótidos CpG se denominan islas CpG y suelen encontrarse en regiones intergénicas y, con frecuencia, en las regiones promotoras de los genes<sup>27</sup>. La metilación de las islas CpG de los promotores está relacionada con la represión de la transcripción, así, las islas CpG de genes que están siendo transcritos de forma activa no suelen presentar metilación, mientras que los genes que no se transcriben, tienden a presentar islas CpG con altos grados de metilación<sup>28</sup>. La metilación de las citosinas reprime la transcripción de una forma directa, ya que provoca la condensación de la cromatina e impide que los factores de transcripción se unan a sus secuencias diana en los promotores. Esta represión de la transcripción también ocurre de forma indirecta, ya que dicha metilación recluta proteínas modificadoras de las histonas, que conducen, a su vez, a un mayor grado de compactación del ADN, impidiendo así la expresión génica<sup>22</sup>.

TIPO DE MODIFICACIÓN	EFEECTO
Metilación de CpG en promotores	Represión de la transcripción
Modificaciones postranscripcionales de histonas	
Acetilación	Activación de la transcripción
Mono-/di-/tri-metilación	Activación o represión de la transcripción
Otras	Muy variable
Mediados por RNAs	
lncRNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inactivación cromosómica</li> <li>• Imprinting</li> <li>• Regulación de la transcripción</li> <li>• Splicing</li> <li>• Traducción y silenciamiento de RNA mensajero</li> </ul>
miRNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Silenciamiento génico</li> <li>• Degradación de RNA</li> </ul>
siRNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Silenciamiento de RNA</li> <li>• Degradación de RNA</li> </ul>
piRNA	Silenciamiento de RNA
snRNA	Splicing
snoRNA	Modificaciones postranscripcionales de ARN ribosómico, de transferencia y snRNA
Y-RNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control de calidad de ARN no codificante</li> <li>• Procesamiento de ARN mensajero</li> <li>• Represión de la unión inespecífica de ARN mensajeros a Ro60</li> <li>• Replicación del ADN</li> </ul>

Tabla I. Resumen de mecanismos epigenéticos

En el ámbito de la Inmunología, y en particular de las enfermedades alérgicas, se han realizado numerosos estudios de la función y los efectos de la metilación del ADN en los promotores de diversos genes relacionados con la susceptibilidad de padecer enfermedades alérgicas o con la diferenciación de los distintos tipos celulares del sistema inmune y su maduración<sup>29-32</sup>. De este modo, se ha comprobado que durante la diferenciación de los linfocitos CD4+ hacia linfocitos Th1, Th2 o Th17 se producen hipermetilaciones diferenciales en diferentes regiones promotoras que, dependiendo del destino final de la célula, implican la represión de la expresión de determinadas citocinas<sup>33-35</sup>.

Asimismo, se han llevado a cabo diversos estudios de asociación del epigenoma completo, denominados EWAS por sus siglas en inglés (Epigenome-Wide Association Studies), entre ellos uno de nuestro grupo, a fin de determinar patrones de metilación diferenciales asociados a ciertas patologías<sup>36,37</sup>, o incluso el efecto de la exposición a diferentes agentes sobre el patrón de metilación del ADN<sup>38,39</sup>, que han dejado patente que tanto los factores ambientales como la edad, tienen un efecto sobre el patrón de metilación de un determinado tipo celular, y que determinados genes se verán expresados y reprimidos por efecto de factores ambientales.

## Modificaciones postraduccionales de las histonas

El segundo grupo de modificaciones epigenéticas engloba gran variedad de modificaciones postraduccionales que ocurren en las histonas, las unidades proteicas que forman los nucleosomas y que permiten el empaquetamiento del ADN de una forma coherente y con diferentes grados de compactación<sup>40</sup>. Estas modificaciones postraduccionales son uniones covalentes (que se producen en los extremos N-terminal o C-terminal de las histonas) de distintos grupos funcionales, como grupos metilo, acetilo y fosfato, pero también de unidades de mayor volumen, como los grupos SUMO (de alrededor de 100 aminoácidos), las ubiquitinaciones (de 76 aminoácidos), y las ADP-ribosilaciones<sup>41</sup>. En definitiva, todas estas modificaciones ejercen un efecto directo sobre la expresión de los genes, ya que provocan el reclutamiento de diferentes complejos enzimáticos, cuyo efecto final será la inducción o la represión de la transcripción de genes; o indirecto, ya que también producen cambios en la compactación de la cromatina, haciéndola más accesible para los factores de transcripción y las polimerasas o produciendo un incremento de la compactación de la cromatina, que conduce, a su vez, al silenciamiento génico<sup>41</sup>.

Las posibles combinaciones de estas “etiquetas” en las histonas son tan numerosas que, para comprender el efecto de estas modificaciones postraduccionales, se ha planteado la hipótesis del código de histonas, según la cual, el conjunto de modificaciones postraduccionales en una región del genoma tendrá un efecto inductor o represor de la expresión<sup>42</sup>. De esta forma, estudios exhaustivos han establecido que la acetilación de las histonas se asocia primariamente con activación génica, mientras que la metilación, dependiendo de su posición y grado (mono-, di-, tri-) se asocia tanto con activación como con represión<sup>43-48</sup>. No obstante, incluso estos estudios no han sido capaces de describir de una forma integral cómo se regula la expresión génica. Estudios más ambiciosos

han intentado arrojar luz sobre qué combinación de estas modificaciones se asocia a la expresión génica y, de este modo, se han descrito en linfocitos T CD4+, 17 modificaciones características (H2A.Z, H2BK5ac, H2BK12ac, H2BK20ac, H2BK120ac, H3K4ac, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me1, H3K18ac, H3K27ac, H3K36ac, H4K5ac, H4K8ac and H4K91ac), que se encuentran presentes en las regiones promotoras de los genes que tienen una mayor expresión, respecto a las de aquellos que no tienen este nivel de expresión<sup>49</sup>. Este nivel de complejidad explica la dificultad para asociar determinada modificación postraducciona a un grado de expresión o silenciamiento del ADN. Aun así, en el campo de la Inmunología, y en el de la Alergología en particular, se han realizado numerosos intentos<sup>50</sup> por comprender el espectro de modificaciones postraduccionales de las histonas durante el desarrollo y diferenciación celulares<sup>51-53</sup>, la asociación con determinadas patologías alérgicas<sup>54-57</sup>, o los efectos ambientales sobre estas modificaciones<sup>58</sup>.

## Mecanismos dependientes de ARN no codificantes

El último gran grupo de mecanismos epigenéticos es el que engloba aquellos mecanismos mediados por ARN no codificantes. Este grupo es heterogéneo, tanto en los mecanismos como en la naturaleza de los ARN. Estos ARN pueden producir efectos sobre la expresión génica o actuar a nivel postranscripcional. Los papeles de los ARN ribosómicos y de transferencia son de sobra conocidos y resulta evidente que los cambios en estos ARN afectarán a la función celular.

Los ARN no codificantes se clasifican en función de su tamaño; así, los que constan de una secuencia de más de 200 nucleótidos se denominan ARN largos no codificantes (lncRNA). Estos lncRNA tienen funciones variadas, que incluyen la inactivación cromosómica<sup>59</sup> y el sellado genómico (imprinting)<sup>60</sup>, la regulación de la transcripción de genes específicos<sup>61</sup>, la regulación postranscripcional mediante ajuste (splicing)<sup>62</sup>, la traducción<sup>63</sup> y el silenciamiento de ARN, mediado por la maquinaria del ARN de interferencia<sup>64</sup>. En el ámbito de la investigación de las enfermedades alérgicas, varios estudios han mostrado la expresión diferencial de lncRNA en diferentes patologías, como la dermatitis atópica<sup>65</sup> o el asma<sup>66,67</sup>, por ejemplo, que revelan su gran potencial como biomarcadores en enfermedades alérgicas.

En contraposición con los lncRNA, los ARN pequeños poseen un tamaño inferior a los 200 nucleótidos. Dentro de este grupo se encuentran los micro ARN (miRNA), los ARN pequeños de interferencia (siRNA), los ARN asociados a Piwi (piRNA) y los ARN nucleolares pequeños (snoRNA), los ARN nucleares pequeños (snRNA) y los ARN citoplasmáticos pequeños (Y-RNA). Sus mecanismos de acción son diversos, siendo el más estudiado el mecanismo de interferencia del ARN<sup>14</sup>, proceso por el que estos ARN no codificantes se unen al ARN mensajero y conducen a su degradación, su secuestro o la inhibición de su traducción<sup>68</sup>.

Dentro de este grupo, los más estudiados son los micro ARN (miRNA), cuyo tamaño va de 17 a 25 nucleótidos y cuya secuencia permite la unión a diversos ARN mensajeros

de una forma más inespecífica que los ARN pequeños de interferencia (siRNA). Diversos estudios funcionales han puesto de manifiesto que los miRNA están involucrados en la práctica totalidad de procesos celulares y que las alteraciones en su expresión están asociadas a muchas patologías humanas<sup>69</sup>.

Entre los micro ARN relacionados con el sistema inmune, miR-21, miR-146a y miR-155 son los que más extensamente se han estudiado, habiéndose demostrado de forma fehaciente que regulan tanto la respuesta inmune como la inflamación de tejidos en enfermedades alérgicas<sup>70</sup>. Adicionalmente, se está empezando a plantear su uso como biomarcador en las enfermedades alérgicas, ya que se ha descrito en diferentes patologías tanto la presencia de determinados miRNA en suero, como su posible función en la comunicación intercelular<sup>71-73</sup>.

## **Y-RNA: Nuevas perspectivas en la regulación de la respuesta inmune**

Otro de los ARN pequeños no codificantes cuya relevancia va en aumento en el campo de la inmunología es el grupo de los Y-RNA o ARN citoplasmáticos (cytoplasmic RNAs), en contraposición a los ARN nucleares pequeños o U ARN (nuclear RNAs). En ambos casos, estos ARN fueron descubiertos como componentes de complejos ribonucleoproteicos que eran diana antigénica de anticuerpos producidos por pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES)<sup>74</sup>.

Los snRNA U1a, U1b, U2 U4, U5 y U6 fueron descubiertos en extractos nucleares como componentes de complejos ribonucleoproteicos junto con las proteínas RNP y Sm (ambas con capacidad antigénica en el LES)<sup>75</sup>. Este complejo es conocido como snRNP y forma parte del ayustosoma (spliceosome), cuya función en el procesamiento del ARN mensajero es ampliamente conocida<sup>76</sup>.

Asimismo, los Y-RNA fueron descritos como componentes de complejos ribonucleoproteicos de origen citoplasmático junto con las proteínas Ro60 y La (RNP-Ro60), que igualmente fueron caracterizadas como antígenos de autoanticuerpos presentes en pacientes con LES<sup>74</sup>. Al igual que los snRNA, los Y-RNA muestran un alto grado de conservación a lo largo de la escala evolutiva, y se han encontrado ortólogos de la RNP-Ro60 desde las bacterias hasta los mamíferos<sup>77,78</sup>. En los humanos se han descrito 4 Y-RNA diferentes, RNY1, RNY3, RNY4 y RNY5 y más de 1.000 pseudogenes, con una identidad en torno al 90% con algunos de los 4 RNY, y que son el producto de eventos relativamente recientes de retrotransposición<sup>78,79</sup>. Los Y-RNA tienen un tamaño que varía entre los 75 y los 115 nucleótidos y, aunque difieren ligeramente en sus estructuras primaria y secundaria, poseen una estructura típica que consta de un tallo de doble hélice, con las bases apareadas, formado por los extremos 5' y 3' del ARN. Próximo al extremo 5' se encuentra una citosina no apareada que forma una protuberancia en la estructura necesaria para el reconocimiento por parte de Ro60<sup>77</sup>.

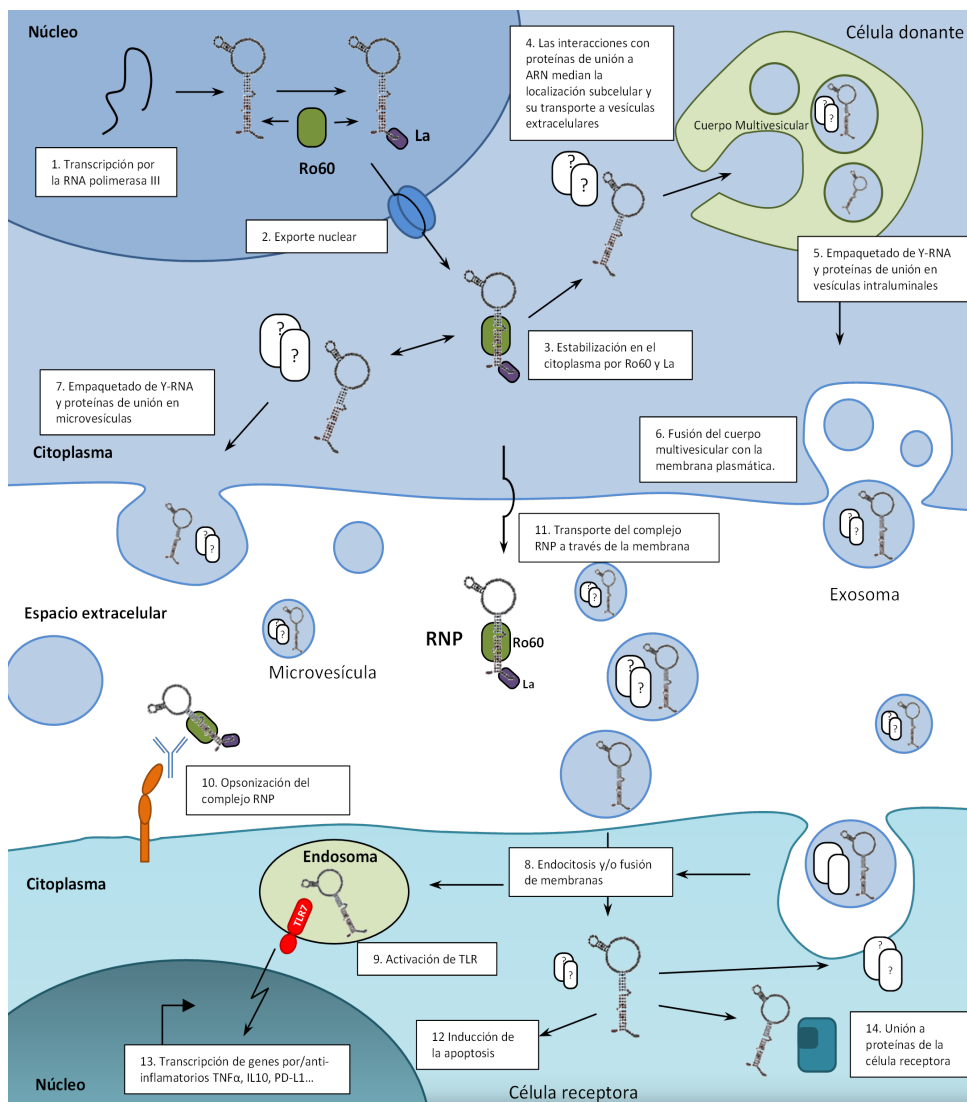


Imagen 1. Ilustración del ciclo de vida de los Y-RNA

Rutas putativas de liberación de Y-RNA al espacio extracelular y posibles funciones de los Y-RNA transferidos a las células diana. Tras la transcripción (1), los Y-RNA son exportados al citoplasma (2). En el citoplasma, la unión de Ro60 estabiliza el Y-RNA (3), donde puede unirse a otras proteínas de unión a ARN, influyendo en su localización o destino (4). Los Y-RNA pueden ser empaquetados junto con otras proteínas de unión en vesículas intraluminales de los cuerpos multivesiculares (5) y secretadas en exosomas (6) o empaquetadas en microvesículas (7). Las vesículas extracelulares son captadas por las células receptoras y endocitadas (8) pudiendo llegar a compartimentos endosomales donde podrían activar los receptores del tipo Toll (TLR) (9). La activación de los TLR también ocurre tras la internalización de los complejos RNP opsonizados (10), liberados por las células emisoras tras su translocación a través de la membrana plasmática (11). Se ha comprobado que los Y-RNA desnudos pueden inducir apoptosis (12). La activación de la ruta TLR conduce a la transcripción de varios citocinas pro- y anti-inflamatorias (13). Adicionalmente y de forma más especulativa, los Y-RNA también podrían interactuar con otras proteínas de unión a RNA en las células receptoras (14). Imagen adaptada de 87.

A pesar de que los Y-RNA han sido menos estudiados que los snRNA, se han descrito dos funciones de estos ARN (*Imagen 1*). La más conocida es formar parte de un complejo ribonucleoproteico con Ro60 y otras proteínas<sup>80</sup>. Los estudios funcionales de dicho complejo sugieren un papel en el control de calidad de ARN no codificantes que precisan un plegado especial, como es el caso de los ARN ribosómicos o ARN de transferencia<sup>81,82</sup>; en el procesado de ARN mensajeros; y uniéndose a los extremos 3' libres de ARN cuyo plegamiento es incorrecto<sup>83</sup>. La unión de los Y-RNA a la proteína Ro60, y a otros componentes del complejo, regularía este control de calidad y afectaría a la unión del complejo a determinados ARN diana, afectando a la disponibilidad o localización subcelular de los complejos RNP<sup>81</sup>. También se ha descrito que los Y-RNA actúan como represores de la unión inespecífica del extremo 3' de ARN a Ro60<sup>80</sup>. Los estudios realizados en *Deinococcus radiodurans* sugieren, a su vez, una función de este complejo en la vía de degradación del ARN<sup>84</sup>. La otra función de los Y-RNA descrita tiene que ver con la replicación del ADN, que es independiente de su asociación al complejo ribonucleoproteico de Ro60<sup>85</sup>. Aunque no se conoce el mecanismo exacto por el que sucede, se ha observado que determinados Y-RNA inducen un aumento en la replicación del ADN, observándose un incremento de la unión de Y-RNA a la cromatina durante la replicación, posiblemente asociada a los complejos de los orígenes de replicación<sup>86</sup>.

Además de las funciones descritas, su presencia en espacios extracelulares, ya sea formando complejos ribonucleoproteicos o asociados a vesículas extracelulares, apunta a que pueden tener un papel en la transmisión de señales, amplificación o modulación de diferentes respuestas a nivel local o sistémico en las células receptoras de estos Y-RNA<sup>87</sup>. Se han encontrado Y-RNA en espacios extracelulares y en varios tipos de fluidos corporales como la saliva, el fluido seminal y especialmente en el suero sanguíneo, donde es el tipo de ARN más abundante<sup>88</sup>.

Aunque el número de estudios sobre los efectos de los Y-RNA extracelulares es todavía limitado, se ha descrito la participación de los Y-RNA en la regulación de la respuesta inmune, asociándoles tanto efectos proinflamatorios como anti-inflamatorios<sup>89-91</sup>. Asimismo, se ha descrito que los Y-RNA tienen función inmunosupresora, ya que la presencia de Y-RNA en plasma seminal tiene un papel inmunosupresor que reduce el rechazo de los espermatozoides<sup>92,93</sup>; que los parásitos nematodos liberan vesículas con ARN que poseen una estructura similar a los Y-RNA que suprimen la emisión de citocinas en ratones<sup>94</sup>; y que las células dendríticas con una función inmunosupresora poseen niveles más altos de Y-RNA que aquellas con un fenotipo inmunoactivador<sup>95</sup>.

Adicionalmente, hay estudios sobre los efectos proapoptóticos de Y-RNA en células sanas emitidos por células cancerígenas<sup>96</sup>; en macrófagos, por Y-RNA emitidos por cardiomiocitos en la fibrosis fetal cardíaca<sup>97</sup>; y de Y-RNA emitidos por macrófagos en la aterosclerosis<sup>98</sup>. En estas circunstancias, RNY3 es exportado a la membrana plasmática o a vesículas extracelulares y, cuando no está formando parte de complejos ribonucleoproteicos, es capaz de activar la cascada proinflamatoria en macrófagos, al interactuar con receptores de tipo Toll (TLR) con la consiguiente liberación de TNF- $\alpha$ , mientras que cuando está unido a Ro60, esta interacción con los receptores no es posible<sup>98</sup>. No obstante, en determinadas patologías autoinmunitarias, como el LES y el Síndrome de Sjög-



gren, donde se generan anticuerpos contra componentes del complejo RNP-Ro60, la presencia de dichos complejos expuestos en la membrana celular provocaría la unión del antígeno-anticuerpo, que desencadenaría la respuesta proinflamatoria dependiente de TLR<sup>98</sup>. Por su parte, la asociación de vesículas extracelulares con autoanticuerpos de diversas enfermedades autoinmunes, produciría complejos proinflamatorios que contribuyen a dichas patologías<sup>99</sup>.

Otros estudios han descrito cómo vesículas extracelulares procedentes de linfocitos B cancerígenos poseen Y4, que, además de inducir efectos inflamatorios mediante la liberación de CCL2, CCL4 e IL6 en los monocitos<sup>91</sup>, induce la expresión de PD-L1 en estas células, inhibiendo así la activación de linfocitos T<sup>100</sup>. También se ha descrito cómo Y4 induce la producción y liberación de IL10 en macrófagos que reduce el daño tras el infarto<sup>90</sup>.

Adicionalmente, la abundancia de Y-RNA en sangre hace que sea interesante su estudio como posible fuente de biomarcadores de diferentes patologías, como ya se ha visto en diversos tipos de cáncer<sup>91,101-103</sup>, en aterosclerosis y en enfermedad arterial coronaria<sup>104</sup>.

Se está comenzando a entender el papel que desempeñan los Y-RNA extracelulares en la regulación del sistema inmune. Nuestro grupo ha realizado un estudio pionero en enfermedades alérgicas en el que hemos encontrado una asociación entre el aumento en la expresión de un grupo de Y-RNA y la posibilidad de padecer alergia (Isidoro, M. et al., YRNAs overexpression and potential implications in Allergy, *World Allergy Organization Journal*, in press) y, aunque por el momento no haya más estudios similares, de acuerdo con el papel de estos Y-RNA en algunos procesos inflamatorios, nuestro estudio abre la posibilidad de que estos pequeños ARN desempeñen una función en la modulación de la respuesta alérgica o que puedan ser utilizados como biomarcadores de la enfermedad más específicos o sensibles que los actuales.

En definitiva, podemos afirmar que la complejidad de los mecanismos epigenéticos que subyacen a la aparición de las enfermedades alérgicas requiere un refuerzo en las acciones del ámbito de la investigación de estas patologías, ya sea básica o traslacional, que permitan abordar los retos de futuro que suponen para nuestra sociedad.

## Bibliografía

1. Sicherer, S. H. & Sampson, H. A. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 291–307.e5 (2014).
2. Anandan, C., Nurmatov, U., van Schayck, O. C. P. & Sheikh, A. Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. *Allergy* 65, 152–167 (2010).
3. Pfefferle, P. I. & Renz, H. Microbial Exposure and Onset of Allergic Diseases - Potential Prevention Strategies? *Allergol. Int.* 63, 3–10 (2014).
4. Strachan, D. P. Family size, infection and atopy: the first decade of the 'hygiene hypothesis'. *Thorax* 55 Suppl 1, S2-10 (2000).
5. Tamari, M. & Hirota, T. Genome-wide association studies of atopic dermatitis. *J. Dermatol.* 41, 213–220 (2014).
6. Akhbar, L. & Sandford, A. J. Genome-wide association studies for discovery of genes involved in asthma. *Respirology* 16, 396–406 (2011).
7. Tamari, M., ShotaTanaka & Hirota, T. Genome-Wide Association Studies of Allergic Diseases. *Allergol. Int.* 62, 21–28 (2013).
8. García-Sánchez, A. et al. Genome-wide association studies (GWAS) and their importance in asthma. *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. 43, 601–608 (2015).
9. Galli, S. J. *Allergy. Curr. Biol.* 10, R93–R95 (2000).
10. Renz, H. et al. Gene-environment interaction in chronic disease: A European Science Foundation Forward Look. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128, S27–S49 (2011).
11. von Mutius, E. Gene-environment interactions in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 3–11 (2009).
12. Potaczek, D. P. et al. Epigenetics and allergy: from basic mechanisms to clinical applications. *Epigenomics* 9, 539–571 (2017).
13. Waddington, C. H. *The Strategy of the Genes.* (1957).
14. Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–11 (1998).
15. Bird, A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396–398 (2007).
16. Dupont, C., Armant, D. & Brenner, C. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. *Semin. Reprod. Med.* 27, 351–357 (2009).
17. Isidoro-García, M., Dávila-González, I., Pascual de Pedro, M., Sanz-Lozano, C. & Lorente-Toledano, F. Interactions between genes and the environment. Epigenetics in allergy. *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. 35, 254–8 (2007).
18. Berger, S. L., Kouzarides, T., Shiekhhattar, R. & Shilatifard, A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 23, 781–783 (2009).
19. Helm, M. & Alfonzo, J. D. Posttranscriptional RNA Modifications: Playing Metabolic Games in a Cell's Chemical Legoland. *Chem. Biol.* 21, 174–185 (2014).
20. Chi, K. R. The RNA code comes into focus. *Nature* 542, 503–506 (2017).
21. Jabbari, K. & Bernardi, G. Cytosine methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA frequencies. *Gene* 333, 143–149 (2004).
22. Deaton, A. M. & Bird, A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 25, 1010–1022 (2011).
23. Wu, T. P. et al. DNA methylation on N6-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature* 532, 329–333 (2016).
24. Huang, W. et al. Determination of DNA adenine methylation in genomes of mammals and plants by liquid chromatography/mass spectrometry. *RSC Adv.* 5, 64046–64054 (2015).

25. Wu, Y., Zhou, C. & Yuan, Q. Role of DNA and RNA N6-Adenine Methylation in Regulating Stem Cell Fate. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 13, 31–38 (2017).
26. Parashar, N. C., Parashar, G., Nayyar, H. & Sandhir, R. N 6 -adenine DNA methylation demystified in eukaryotic genome: From biology to pathology. *Biochimie* 144, 56–62 (2018).
27. Takai, D. & Jones, P. A. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 3740–3745 (2002).
28. Schübeler, D. Function and information content of DNA methylation. *Nature* 517, 321–326 (2015).
29. Michel, S. et al. Farm exposure and time trends in early childhood may influence DNA methylation in genes related to asthma and allergy. *Allergy* 68, 355–364 (2013).
30. Canani, R. B. et al. Differences in DNA methylation profile of Th1 and Th2 cytokine genes are associated with tolerance acquisition in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Clin. Epigenetics* 7, 38 (2015).
31. Kwon, N.-H., Kim, J.-S., Lee, J.-Y., Oh, M.-J. & Choi, D.-C. DNA Methylation and the Expression of IL-4 and IFN- $\gamma$  Promoter Genes in Patients with Bronchial Asthma. *J. Clin. Immunol.* 28, 139–146 (2008).
32. Kim, E.-G. G. et al. DNA methylation and not allelic variation regulates STAT6 expression in human T cells. *Clin. Exp. Med.* 10, 143–152 (2010).
33. Suarez-Alvarez, B., Rodriguez, R. M., Fraga, M. F. & López-Larrea, C. DNA methylation: A promising landscape for immune system-related diseases. *Trends Genet.* 28, 506–514 (2012).
34. Cohen, C. J. et al. Human Th1 and Th17 Cells Exhibit Epigenetic Stability at Signature Cytokine and Transcription Factor Loci. *J. Immunol.* 187, 5615–5626 (2011).
35. Santangelo, S., Cousins, D. J., Triantaphyllopoulos, K. & Staynov, D. Z. Chromatin structure and DNA methylation of the IL-4 gene in human TH2 cells. *Chromosom. Res.* 17, 485–496 (2009).
36. Nestor, C. E. et al. DNA Methylation Changes Separate Allergic Patients from Healthy Controls and May Reflect Altered CD4+ T-Cell Population Structure. *PLoS Genet.* 10, e1004059 (2014).
37. Pascual, M. et al. Epigenetic changes in B lymphocytes associated with house dust mite allergic asthma. *Epigenetics* 6, 1131–1137 (2011).
38. Joehanes, R. et al. Epigenetic Signatures of Cigarette Smoking. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 9, 436–447 (2016).
39. Joubert, B. R. et al. DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 98, 680–696 (2016).
40. Woodcock, C. L. & Ghosh, R. P. Chromatin Higher-order Structure and Dynamics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000596–a000596 (2010).
41. Zentner, G. E. & Henikoff, S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 259–266 (2013).
42. Jenuwein, T. Translating the Histone Code. *Science* (80-. ). 293, 1074–1080 (2001).
43. Kuo, M.-H. & Allis, C. D. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays* 20, 615–626 (1998).
44. Berger, S. L. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 142–8 (2002).
45. Bulger, M. Hyperacetylated Chromatin Domains: Lessons from Heterochromatin. *J. Biol. Chem.* 280, 21689–21692 (2005).
46. Li, B., Carey, M. & Workman, J. L. The Role of Chromatin during Transcription. *Cell* 128, 707–719 (2007).
47. Shahbazian, M. D. & Grunstein, M. Functions of Site-Specific Histone Acetylation and Deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 75–100 (2007).
48. Berger, S. L. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407–412 (2007).
49. Wang, Z. et al. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat. Genet.* 40, 897–903 (2008).

50. Alaskhar Alhamwe, B. et al. Histone modifications and their role in epigenetics of atopy and allergic diseases. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* 14, 39 (2018).
51. Wei, G. et al. Global Mapping of H3K4me3 and H3K27me3 Reveals Specificity and Plasticity in Lineage Fate Determination of Differentiating CD4+ T Cells. *Immunity* 30, 155–167 (2009).
52. Chang, S. & Aune, T. M. Dynamic changes in histone-methylation 'marks' across the locus encoding interferon- $\gamma$  during the differentiation of T helper type 2 cells. *Nat. Immunol.* 8, 723–731 (2007).
53. Harb, H. et al. Epigenetic Regulation in Early Childhood: A Miniaturized and Validated Method to Assess Histone Acetylation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 168, 173–181 (2015).
54. Seumois, G. et al. Epigenomic analysis of primary human T cells reveals enhancers associated with TH2 memory cell differentiation and asthma susceptibility. *Nat. Immunol.* 15, 777–788 (2014).
55. Clifford, R. L., John, A. E., Brightling, C. E. & Knox, A. J. Abnormal Histone Methylation Is Responsible for Increased Vascular Endothelial Growth Factor 165a Secretion from Airway Smooth Muscle Cells in Asthma. *J. Immunol.* 189, 819–831 (2012).
56. Stefanowicz, D. et al. Elevated H3K18 acetylation in airway epithelial cells of asthmatic subjects. *Respir. Res.* 16, 95 (2015).
57. Yu, Q. et al. Inhibition of H3K27me3 demethylases attenuates asthma by reversing the shift in airway smooth muscle phenotype. *Clin. Exp. Allergy* 48, 1439–1452 (2018).
58. Rehan, V. K. et al. Perinatal nicotine exposure induces asthma in second generation offspring. *BMC Med.* 10, 129 (2012).
59. Wutz, A. & Gribnau, J. X inactivation Xplained. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17, 387–393 (2007).
60. Braidotti, G. et al. The Air noncoding RNA: an imprinted cis-silencing transcript. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 69, 55–66 (2004).
61. Luo, S. et al. Divergent lncRNAs Regulate Gene Expression and Lineage Differentiation in Pluripotent Cells. *Cell Stem Cell* 18, 637–652 (2016).
62. Beltran, M. et al. A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes Dev.* 22, 756–769 (2008).
63. Wang, H. et al. Dendritic BC1 RNA in translational control mechanisms. *J. Cell Biol.* 171, 811–821 (2005).
64. Golden, D. E., Gerbasi, V. R. & Sontheimer, E. J. An Inside Job for siRNAs. *Mol. Cell* 31, 309–312 (2008).
65. Tsoi, L. C. et al. Atopic Dermatitis Is an IL-13–Dominant Disease with Greater Molecular Heterogeneity Compared to Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* (2019). doi:10.1016/j.jid.2018.12.018
66. Qi, X. et al. Aberrantly expressed lncRNAs identified by microarray analysis in CD4+T cells in asthmatic patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 503, 1557–1562 (2018).
67. Zhu, Y.-J., Mao, D., Gao, W. & Hu, H. Peripheral whole blood lncRNA expression analysis in patients with eosinophilic asthma. *Medicine (Baltimore)*. 97, e9817 (2018).
68. Lee, D. & Shin, C. MicroRNA-target interactions: new insights from genome-wide approaches. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1271, 118–128 (2012).
69. Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* 11, 597–610 (2010).
70. Rebane, A. microRNA and Allergy. in *Advances in experimental medicine and biology* 888, 331–352 (2015).
71. Yu, H., Guan, Z., Cuk, K., Brenner, H. & Zhang, Y. Circulating microRNA biomarkers for lung cancer detection in Western populations. *Cancer Med.* 7, 4849–4862 (2018).
72. Sinha, A. et al. Exosome-enclosed microRNAs in exhaled breath hold potential for biomarker discovery in patients with pulmonary diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132, 219–222.e7 (2013).
73. Maes, T. et al. Asthma inflammatory phenotypes show differential microRNA expression in sputum. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 1433–1446 (2016).

74. Lerner, M. R., Boyle, J. A., Hardin, J. A. & Steitz, J. A. Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus. *Science* (80- ). 211, 400–2 (1981).
75. Lerner, M. R. & Steitz, J. A. Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 5495–9 (1979).
76. Will, C. L. & Luhrmann, R. Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a003707–a003707 (2011).
77. Teunissen, S. W. et al. Conserved features of Y RNAs: a comparison of experimentally derived secondary structures. *Nucleic Acids Res.* 28, 610–9 (2000).
78. Perreault, J., Perreault, J.-P. & Boire, G. Ro-Associated Y RNAs in Metazoans: Evolution and Diversification. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1678–1689 (2007).
79. Perreault, J. et al. Retropseudogenes derived from the human Ro/SS-A autoantigen-associated hY RNAs. *Nucleic Acids Res.* 33, 2032–41 (2005).
80. Stein, A. J., Fuchs, G., Fu, C., Wolin, S. L. & Reinisch, K. M. Structural Insights into RNA Quality Control: The Ro Autoantigen Binds Misfolded RNAs via Its Central Cavity. *Cell* 121, 529–539 (2005).
81. Chen, X. & Wolin, S. L. The Ro 60 kDa autoantigen: insights into cellular function and role in autoimmunity. *J. Mol. Med. (Berl.)* 82, 232–9 (2004).
82. Hogg, J. R. & Collins, K. Human Y5 RNA specializes a Ro ribonucleoprotein for 5S ribosomal RNA quality control. *Genes Dev.* 21, 3067–3072 (2007).
83. Fuchs, G., Stein, A. J., Fu, C., Reinisch, K. M. & Wolin, S. L. Structural and biochemical basis for misfolded RNA recognition by the Ro autoantigen. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1002–1009 (2006).
84. Chen, X. et al. An ortholog of the Ro autoantigen functions in 23S rRNA maturation in *D. radiodurans*. *Genes Dev.* 21, 1328–1339 (2007).
85. Christov, C. P., Gardiner, T. J., Szuts, D. & Krude, T. Functional Requirement of Noncoding Y RNAs for Human Chromosomal DNA Replication. *Mol. Cell. Biol.* 26, 6993–7004 (2006).
86. Kheir, E. & Krude, T. Non-coding Y RNAs associate with early replicating euchromatin in concordance with the origin recognition complex. *J. Cell Sci.* 130, 1239–1250 (2017).
87. Driedonks, T. A. P. & Nolte-<sup>t</sup>Hoen, E. N. M. Circulating Y-RNAs in Extracellular Vesicles and Ribonucleoprotein Complexes; Implications for the Immune System. *Front. Immunol.* 9, 3164 (2019).
88. Yeri, A. et al. Total Extracellular Small RNA Profiles from Plasma, Saliva and Urine of Healthy Subjects. *Sci. Rep.* 7, 44061 (2017).
89. Hizir, Z., Bottini, S., Grandjean, V., Trabucchi, M. & Repetto, E. RNY (YRNA)-derived small RNAs regulate cell death and inflammation in monocytes/macrophages. *Cell Death Dis.* 8, e2530–e2530 (2017).
90. Cambier, L. et al. Y RNA fragment in extracellular vesicles confers cardioprotection via modulation of IL 10 expression and secretion. *EMBO Mol. Med.* 9, 337–352 (2017).
91. Haderk, F. et al. Tumor-derived exosomes modulate PD-L1 expression in monocytes. *Sci. Immunol.* 2, eaah5509 (2017).
92. Vojtech, L. et al. Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res.* 42, 7290–7304 (2014).
93. Skibinski, G., Kelly, R. W., Harkiss, D. & James, K. Immunosuppression by human seminal plasma--extracellular organelles (prostasomes) modulate activity of phagocytic cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 28, 97–103 (1992).
94. Buck, A. H. et al. Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nat. Commun.* 5, 5488 (2014).
95. Driedonks, T. A. P. P. et al. Immune stimuli shape the small non-coding transcriptome of extracellular vesicles released by dendritic cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 3857–3875 (2018).

96. Chakraborty, S. K., Prakash, A., Nechooshtan, G., Hearn, S. & Gingeras, T. R. Extracellular vesicle-mediated transfer of processed and functional RNY5 RNA. *RNA* 21, 1966–1979 (2015).
97. Clancy, R. M. et al. Ro60-Associated Single-Stranded RNA Links Inflammation with Fetal Cardiac Fibrosis via Ligation of TLRs: A Novel Pathway to Autoimmune-Associated Heart Block. *J. Immunol.* 184, 2148–2155 (2010).
98. Reed, J. H., Sim, S., Wolin, S. L., Clancy, R. M. & Buyon, J. P. Ro60 Requires Y3 RNA for Cell Surface Exposure and Inflammation Associated with Cardiac Manifestations of Neonatal Lupus. *J. Immunol.* 191, 110–116 (2013).
99. Buzás, E. I., Tóth, E. Á., Sódar, B. W. & Szabó-Taylor, K. É. Molecular interactions at the surface of extracellular vesicles. *Semin. Immunopathol.* 40, 453–464 (2018).
100. Riley, J. L. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol. Rev.* 229, 114–125 (2009).
101. Wei, Z. et al. Coding and noncoding landscape of extracellular RNA released by human glioma stem cells. *Nat. Commun.* 8, 1145 (2017).
102. Dhahbi, J. M. et al. Deep Sequencing of Serum Small RNAs Identifies Patterns of 5' tRNA Half and YRNA Fragment Expression Associated with Breast Cancer. *Biomark. Cancer* 6, BIC.S20764 (2014).
103. Tosar, J. P. et al. Assessment of small RNA sorting into different extracellular fractions revealed by high-throughput sequencing of breast cell lines. *Nucleic Acids Res.* 43, 5601–5616 (2015).
104. Repetto, E. et al. RNY-derived small RNAs as a signature of coronary artery disease. *BMC Med.* 13, 259 (2015).