

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ALERGIA

Tesis Doctoral

**CAMBIOS CLÍNICOS E INMUNOLÓGICOS
INDUCIDOS POR EL TRATAMIENTO CON
INMUNOTERAPIA ESPECÍFICA EN PACIENTES
ALÉRGICOS A POLEN DE GRAMÍNEAS Y/O OLIVO**

Autora: Dña. PILAR CARRASCO SALAS

Directores: Dr. FRANCISCO GUERRA PASADAS
Dr. FRANCISCO FEO BRITO

TITULO: *Cambios clínicos e inmunológicos inducidos por el tratamiento con inmunoterapia específica en pacientes alérgicos a polen de gramíneas y/o olivo*

AUTOR: *Pilar Carrasco Salas*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2015
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

A mi familia y a mi novio, por el apoyo incondicional...



**TÍTULO DE LA TESIS: CAMBIOS CLÍNICOS E INMUNOLÓGICOS
INDUCIDOS POR EL TRATAMIENTO CON INMUNOTERAPIA ESPECÍFICA
EN PACIENTES ALÉRGICOS A POLEN DE GRAMÍNEAS Y/O OLIVO**

DOCTORANDA: PILAR CARRASCO SALAS

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

La alergia al polen tiene un notable impacto clínico en toda Europa, y hay evidencias que sugieren el aumento de la prevalencia de las enfermedades alérgicas respiratorias siendo los pólenes en gran parte los responsables, particularmente en las zonas urbanas de los países industrializados. En Castilla-La Mancha la polinosis representa el 69% de las consultas de rinitis y el 63% de las de asma bronquial. La inmunoterapia específica (ITE) es el tratamiento específico de la alergia respiratoria, modificando el curso natural de la enfermedad alérgica. Sin embargo, el seguimiento clínico de la rinitis y asma por pólenes resulta complicado. Las concentraciones de gramíneas pueden llegar a multiplicarse por cuatro de un año para otro, por lo que esta elevada variabilidad interanual, impide la correcta interpretación del registro de síntomas y medicación, como marcadores evolutivos de los pacientes. Por este motivo, está justificada la necesidad de desarrollar métodos de laboratorio que permitan evaluar la eficacia clínica de la ITE.

El objetivo de este estudio es analizar los cambios clínicos e inmunológicos de la ITE en pacientes alérgicos a pólenes de gramíneas y/o olivo. Con una metodología adecuada al problema a analizar, se obtienen unos resultados relevantes. La ITE incrementa la expresión de células Treg productoras de citocinas reguladoras IL-10 y TGF β . Asimismo, e igualmente en los primeros meses de tratamiento, se comprueban niveles menores de CD40L, cuya interacción con CD40 es imprescindible para la síntesis de IgE por las células B. En la misma línea, se comparó el test de activación de basófilos

con pólenes, en muestras de pacientes tratados y no tratados con ITE. El grupo tratado con IT presentó niveles significativamente más bajos de expresión de CD63 en la superficie celular. Los resultados clínicos mostraron también un notable descenso en número de síntomas, medicación y puntuación del cuestionario de calidad de vida Mini-AQLQ de los pacientes tratados con ITE, con respecto al grupo control.

En cuanto a criterios de calidad, los resultados del estudio se han publicado en dos artículos del *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* (revista oficial de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica).

Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 25 de agosto de 2014.

Firma de los directores


Fdo: Francisco Guerra Pasadas.


Fdo: Francisco Feo Brito

AGRADECIMIENTOS

En primerísimo lugar, me gustaría dar las gracias al inmunólogo D. José Miguel Urrea por dejarme participar en el proyecto de investigación que ideó cuando yo todavía era residente y del que han salido todos los datos de esta Tesis Doctoral. Sin su ayuda y sus consejos estoy segura que nunca podría haber presentado este trabajo. Me llevo muy buenos momentos del tiempo que he trabajado con él.

En segundo lugar, quería agradecer al tutor de residentes del Hospital General de Ciudad Real, D. Vicente Morales Élipe la pasión que me ha transmitido por la especialidad de Análisis Clínicos, el interés que ha mostrado por mi formación y la confianza que ha tenido siempre en mis posibilidades. Ha sido una gran suerte encontrarme con él. Le estaré siempre agradecida.

Dar las gracias también a todo el personal del Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital de Ciudad Real por hacerme pasar tan buenos ratos. A todos y cada uno de ellos, gracias!

Agradecer a mis directores de Tesis, el Dr. Francisco Feo Brito y el Dr. Francisco Guerra Pasadas la disponibilidad, amabilidad y cercanía que me han mostrado, a pesar de las distancias geográficas de los últimos meses.

A mi Paquito darle las gracias por estar a mi lado todos estos años, por su cariño y por su comprensión. Por escucharme y apoyarme en todos esos momentos en los que me parecía imposible terminar esta Tesis Doctoral. Sin él, TODO sería mucho más difícil.

Por último, me gustaría dar las gracias a mi familia: a mis abuelos Diego y Mercedes (que ya no están) y a mi abuela Pepa, a mis hermanos Jose y Paloma y en especial, a mis padres, por arroparme y hacer que nunca me sienta sola. Por estar siempre, en los buenos y en los malos momentos. Y por apoyarme en cada paso que doy. Por todo eso y más, muchas gracias!

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Artículos publicados

Urria JM, Carrasco P, Feo-Brito F, De la Roca F, Guerra F, Cabrera CM. Immunotherapy reduces CD40L and modifies cytokines in CD4 cells of pollen allergy patients. J Investig Allergol Clin Immunol 2014; Vol. 24(2): 98-105.

Urria JM, Feo-Brito F, Carrasco P, De la Roca F, Zamorano J. Allergen-stimulation induces the simultaneous production of Th2 and regulatory cytokines in T cells from patients with pollen allergy. J Investig Allergol Clin Immunol. 2013; 23(1):54-5.

Comunicaciones a Congresos

XXVIII Congreso de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica. Navarra, Octubre 2012. Cambios clínicos e inmunológicos inducidos por el tratamiento con inmunoterapia en pacientes alérgicos a olivo y/o gramíneas. Carrasco Salas P, Urria Ardanaz JM, De la Roca F, Feo Brito F, Guerra F.

I Jornadas de Investigación: Ciudad Real Biomédica. Diciembre, 2011. Cambios inmunológicos inducidos por el tratamiento con inmunoterapia específica en pacientes con alergia al polen. Urria Ardanaz JM, Feo Brito F, Carrasco Salas P, De la Roca F.

V Congreso Nacional de Laboratorio Clínico. Málaga, Noviembre 2011. Perfil de células TCD4 en pacientes alérgicos a polen. Carrasco Salas P, Urria Ardanaz JM, Feo Brito F, Ortega A, Mora G, Muñoz MJ, Rincón De Pablo L, Melero Valencia R, Morales Elipe V.

XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Pamplona, Junio 2011. Elevada proporción de linfocitos TCD4+ productores de IL4 y TGF- β y de células Treg en pacientes con alergia a pólenes. Urria Ardanaz JM, Carrasco Salas P, Feo Brito F, Melero Valencia R, Ortega A, Muñoz MJ, Rodenas Garrido I.

RESUMEN

La alergia se define por una respuesta exagerada del sistema inmune a sustancias ambientales inocuas llamadas alérgenos. La base de estas enfermedades alérgicas parece estar en una respuesta inapropiada de los linfocitos T *helper* tipo 2 (Th2) a los alérgenos. La inmunoterapia alérgeno-específica (ITE) a través de la administración de dosis crecientes de extractos alergénicos, induce tolerancia prolongada a los alérgenos responsables de las manifestaciones alérgicas y representa en la actualidad, el único tratamiento curativo. Sin embargo, los cambios inmunológicos implicados no se conocen a ciencia cierta.

Esta Tesis Doctoral pretende por un lado, esclarecer los mecanismos responsables de la sensibilización alérgica y por otro, estudiar los cambios inmunológicos que se producen en los pacientes alérgicos tras el tratamiento con ITE con el objetivo principal de encontrar parámetros de seguimiento que sean de utilidad clínica para predecir la eficacia de dicho tratamiento.

Para ello, hemos estudiado en primer lugar la respuesta de células Th2, T *helper* tipo 1 (Th1) y células T reguladoras (Treg) después de la estimulación *in vitro* con extractos polínicos, en muestras de pacientes alérgicos a polen de gramíneas y/o olivo y en muestras de controles sanos a través de la expresión de IL-4 (citoquina Th2), de INF- γ (citoquina Th1) y de IL-10, TGF- β y Foxp3 (marcadores de Treg). Posteriormente, y tras dividir a los pacientes alérgicos en dos grupos (un grupo activo que recibió tratamiento con ITE y un grupo control, que sólo recibió tratamiento farmacológico para controlar los síntomas alérgicos) analizamos los cambios inmunológicos inducidos por este tratamiento. Se estudió, además de IL-4, INF- γ , IL-10, TGF- β y Foxp3, la expresión de CTLA-4 (una molécula coestimuladora que inhibe la respuesta de células T y regula la tolerancia periférica), de CD40L (otra molécula coestimuladora que contribuye al cambio de isotipo hacia IgE y aumenta la producción de citoquinas Th2) y de CD63 sobre los basófilos (como indicador de degranulación). Los cambios inmunológicos fueron evaluados conjuntamente con el consumo de fármacos y con los cambios clínicos recogidos por los pacientes en diarios de síntomas y en cuestionarios de calidad de vida.

Antes de iniciar el tratamiento con ITE, se detectó en los pacientes alérgicos con respecto a población sana una respuesta predominante de las células Th2. Además, se observó una mayor producción de TGF- β y Foxp3 por parte de las células T CD4+, lo que indica que las células T de los pacientes alérgicos pueden presentar propiedades reguladoras después de la estimulación *in vitro* con alérgenos específicos. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre *in vitro*, la liberación de citoquinas no se produce satisfactoriamente *in vivo*, aunque las razones para estas observaciones no están claras.

Tras iniciar el tratamiento, se observó en los pacientes alérgicos tratados un cambio en la respuesta inmune de Th2 a Th1 y una mejoría en los síntomas clínicos, junto con una reducción en el consumo de medicación. Además, la producción de IL-10 y TGF- β disminuyó significativamente, mientras que los valores de CTLA-4 y la expresión del factor de transcripción Foxp3 no se modificaron. Estos datos sugieren que la ITE origina inmunorregulación a través de la secreción de citoquinas fundamentalmente.

Sí que hubo en el grupo activo una reducción significativa en el número de células TCD4+ que expresaban en superficie el ligando de CD40. La reducción en la expresión de este ligando puede ser un mecanismo a través del cual dicho tratamiento modula la respuesta a alérgenos. De todos los parámetros estudiados, el CD40L parece ser el más útil para valorar la eficacia del tratamiento con ITE por su coste y baja complejidad analítica.

ÍNDICE

INTRODUCCION	1
I. ALERGIA AL POLEN O POLINOSIS	3
I.1. INTRODUCCIÓN	3
I.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	3
I.2.1. RINITIS	4
I.2.2. ASMA	5
I.2.3. VÍA AÉREA ÚNICA	6
I.3. EPIDEMIOLOGÍA	7
I.4. FISIOPATOLOGÍA DE LA INFLAMACIÓN ALÉRGICA	8
I.4.1. INTRODUCCIÓN	8
I.4.2. LINFOCITOS T <i>HELPER</i>	9
I.4.3. COOPERACIÓN T-B	10
I.4.4. CÉLULAS TREG	11
I.4.5. MECANISMOS DE LA INFLAMACIÓN ALÉRGICA	12
I.4.5.1. FASE DE SENSIBILIZACIÓN	12
I.4.5.2. FASE EFECTORA	13
I.4.6. PAPEL DE LAS CDS EN LA INDUCCIÓN TH1 O TH2	14
I.4.7. CÉLULAS TREG Y ALERGIA	15
I.5. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN LA ALERGIA AL POLEN	17
I.5.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO	17
I.5.2. PRUEBAS FUNCIONALES	17
I.5.3. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS IN VIVO	18

I.5.3.1. PRUEBAS CUTÁNEAS	18
I.5.2. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS IN VITRO	20
I.5.2.1. IGE TOTAL	20
I.5.2.2. IGE ESPECÍFICA	20
I.5.2.3. TEST DE ACTIVACIÓN DE BASÓFILOS	21
I.6. TRATAMIENTO	22
I.6.1. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO	22
I.6.2. ITE	23
I.6.2.1. MECANISMOS INMUNOLÓGICOS	24
I.6.1.1.1. EFECTO SOBRE CÉLULAS T	24
I.6.1.1.2. EFECTO SOBRE CÉLULAS B	25
I.6.1.1.3. EFECTO SOBRE CÉLULAS EFECTORAS	26
I.6.2.2. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN	27
I.6.2.3. INDICACIONES Y CONTRAINDICACIONES	28
I.6.2.4. EFICACIA CLÍNICA	29
I.6.2.5. SEGURIDAD	30
I.7. UTILIZACIÓN DE EXTRACTOS ALERGÉNICOS EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE PACIENTES ALÉRGICOS.	31
I.7.1. OBTENCIÓN DE ALÉRGENOS NATURALES	32
I.7.2. OBTENCIÓN DE ALÉRGENOS RECOMBINANTES	32
I.7.2.1. PROCESO DE PRODUCCIÓN	33
II. EL GRANO DE POLEN	34
II.1. INTRODUCCIÓN	34

II.2. EL POLEN COMO TRANSPORTADOR DE ALÉRGENOS	34
II.3. REACTIVIDAD CRUZADA	36
II.4. CLASIFICACIÓN DE LOS PÓLENES ALERGÉNICOS	36
II.4.1. SEGÚN DISTRIBUCIÓN TAXONÓMICA	36
II.4.2. SEGÚN FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO	37
II.5. POLINIZACIÓN Y CLIMA	38
II.6. NOMENCLATURA DE ALÉRGENOS	38
III. PÓLENES DE INTERÉS EN ALERGOLOGÍA	39
III.1. POACEAE (GRAMÍNEAS)	39
III.1.1. POLINIZACIÓN DE GRAMÍNEAS	41
III.1.2. ALÉRGENOS DE GRAMÍNEAS	41
III.2. OLEÁCEAS	42
III.2. 1. POLINIZACIÓN DEL OLIVO	43
III.2. 2. ALÉRGENOS DEL OLIVO	44
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	46
I. JUSTIFICACIÓN	47
II. OBJETIVOS	48
MATERIAL Y MÉTODOS	49
I. DISEÑO	50

II. SUJETOS DE ESTUDIO	50
II.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	50
II.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	50
II.3. MUESTREO Y TAMAÑO DE LAS MUESTRAS	51
III. TRATAMIENTO	51
III.1. ITE	51
III.2. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO	52
IV. VARIABLES A ESTUDIO	52
IV.1. VARIABLES CLÍNICAS	52
IV.1.1. PRUEBAS CUTÁNEAS	53
IV.1.2. CARTILLA DE SÍNTOMAS Y MEDICACIÓN	53
IV.1.3. CUESTIONARIO DE VIDA MINI-AQLQ	54
IV.2. VARIABLES INMUNOLÓGICAS	55
IV.2.1 NIVELES DE IGE ESPECÍFICA A ALÉRGENOS RECOMBINANTES	55
IV.2.2. ESTUDIO DE MARCADORES DE CÉLULAS TREG Y CÉLULAS TH	56
IV.2.2.1. CITOMETRÍA DE FLUJO	56
IV.2.2.2. MARCAJE CITOPLASMÁTICO Y DE MEMBRANA	59
IV.2.3. ENSAYO DE ACTIVACIÓN DE BASÓFILOS	63
V. PLAN DE TRABAJO	65
VI. ANÁLISIS DE LOS DATOS	66

RESULTADOS	67
I. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO	68
II. PERFIL DE SENSIBILIZACIÓN A ALÉRGENOS DE GRAMÍNEAS Y OLIVO EN LA PROVINCIA DE CIUDAD REAL	70
III. BALANCE ENTRE CÉLULAS TREG Y LINFOCITOS TH EN PACIENTES ALÉRGICOS CON RESPECTO A INDIVIDUOS NO ATÓPICOS	72
III.1. FUNCIÓN DE LINFOCITOS TH	72
III.2. CÉLULAS TREG	73
IV. CAMBIOS INMUNOLÓGICOS INDUCIDOS POR EL TRATAMIENTO CON ITE EN EL GRUPO DE PACIENTES ALÉRGICOS	74
IV.1. FUNCIÓN LINFOCITOS TH2	74
IV.2. FUNCIÓN LINFOCITOS TH1	76
IV.3. CÉLULAS TCD4 FOXP3+	77
IV.4. CÉLULAS TCD4 PRODUCTORAS DE CITOQUINAS SUPRESORAS	78
IV.4.1. CÉLULAS TCD4 PRODUCTORAS DE IL-10	78
IV.4.2. CÉLULAS TCD4 PRODUCTORAS DE TGF- β	79
IV.5. CÉLULAS TCD4 CD152+	81
IV.6. CÉLULAS TCD4 CD154+	82
IV.7. ACTIVACIÓN DE BASÓFILOS	83
V. PARÁMETROS CLÍNICOS	84
VI.1. PRUEBAS CUTÁNEAS	84
VI.2. CRD	85
VI.3. CUESTIONARIO mini-AQLQ	86

DISCUSIÓN	87
I. MAPA DE SENSIBILIZACIÓN DE PACIENTES ALÉRGICOS A OLIVO Y/O GRAMÍNEAS EN CIUDAD REAL	88
I.1. ALÉRGENOS MAYORES Y MENORES	89
I.2. PANALERGENOS	90
II. BALANCE ENTRE CÉLULAS TREG Y LINFOCITOS TH EN PACIENTES ALÉRGICOS CON RESPECTO A INDIVIDUOS NO ATÓPICOS	92
II.1. CÉLULAS T HELPER	93
II.2. CÉLULAS TREG	93
III. CAMBIOS INMUNOLÓGICOS INDUCIDOS POR EL TRATAMIENTO CON ITE EN EL GRUPO DE PACIENTES ALÉRGICOS	94
III.1. BALANCE TH1/TH2	95
III.2. CÉLULAS TREG	97
III.3. CÉLULAS TCD4+CTLA4+	98
III.4. CÉLULAS TCD4+CD154+	99
III.5. TEST DE ACTIVACIÓN DE BASÓFILOS	100
IV. PARÁMETROS CLÍNICOS	101
CONCLUSIONES	103
ANEXOS	107

ANEXO III. TABLAS RESULTADOS. VARIABLES INMUNOLÓGICAS	108
ANEXO IV. TABLAS RESULTADOS. DEMOGRÁFICOS Y VARIABLES CLÍNICAS	113
BIBLIOGRAFÍA	115

TABLAS

I	Clasificación de rinitis	5
II	Rinitis alérgica. Factores de riesgo	5
III	Asma. Factores de riesgo	6
IV	Tipos de reacciones de hipersensibilidad	8
V	Principios generales de la anamnesis alergológica	17
VI	Comparación entre pruebas cutáneas	19
VII	Familia Pooideae	41
VIII	Alérgenos descritos en gramíneas	42
IX	Alérgenos de olivo	49
X	Intervalo normal de basófilos activados en control negativo y control positivo	66
XI	Variables demográficas de la población a estudio	68
XII	Variables demográficas de los pacientes alérgicos	68
XIII	Niveles de IgE específica	70
XIV	Patrón reactividad IgE alérgeno-específica	72

FIGURAS

I	Diferenciación de linfocitos Th1 y Th2 a partir de células Th0	10
II	Fases de la enfermedad alérgica	14
III	Papel de las células Treg en las enfermedades alérgicas	16
IV	Escalones terapéuticos del tratamiento de mantenimiento del asma del adulto	22
V	Abordaje terapéutico de la rinitis alérgica	23
VI	Efectos de la ITE sobre parámetros clínicos e inmunológicos	27
VII	Fotografías al microscopio electrónico de pólenes de la Familia Poaceae	35
VIII	Gramíneas	40
IX	Oleaceae	43
X	Método de detección de IgE específica	56
XI	Señales detectadas en un citómetro	57
XII	Citograma mixto y citograma de fluorescencia	58
XIII	Citómetro FACScan	59
XIV	Panel de sensibilización a alérgenos	71
XV	Mapa sensibilización Ciudad Real	71
XVI	Linfocitos TCD4 productores de IL-4 e IFN- γ	72
XVII	Linfocitos TCD4 Foxp3+	73
XVIII	Linfocitos TCD4 productores de citoquinas supresoras	74
XIX	Linfocitos TCD4 productores de IL-4. Valoración intragrupo	75
XX	Linfocitos TCD4 productores de IL-4. Valoración intergrupo	75
XXI	Linfocitos TCD4 productores de IFN- γ . Valoración intragrupo	77
XXII	Linfocitos TCD4 productores de IFN- γ . Valoración intergrupo	77
XXIII	Linfocitos TCD4 Foxp3+. Valoración intragrupo	77
XXIV	Linfocitos TCD4 Foxp3+. Valoración intergrupo	78
XXV	Linfocitos TCD4 productores de IL-10. Valoración intragrupo	79
XXVI	Linfocitos TCD4 productores de IL-10. Valoración intergrupo	79
XXVII	Linfocitos TCD4 productores de TGF- β . Valoración intragrupo	80
XXVIII	Linfocitos TCD4 productores de TGF- β . Valoración intergrupo	81
XXIX	Linfocitos TCD4 CD152+. Valoración intragrupo	81

XXX	Linfocitos TCD4 CD152+. Valoración intergrupo	82
XXXI	Linfocitos TCD4 CD154+. Valoración intragrupo	82
XXXII	Linfocitos TCD4 CD154+. Valoración intergrupo	83
XXXIII	Activación de basófilos. Valoración intragrupo	84
XXXIV	Activación de basófilos. Valoración intergrupo	86
XXXV	Valores de las pruebas cutáneas en T0 para olivo y gramíneas	84
XXXVI	Valores de las pruebas cutáneas en T2 para gramíneas	85
XXXVII	Puntuaciones totales de los CRD	85
XXXX	Puntuaciones del cuestionario miniAQLQ	86

ABREVIATURAS

APC	Células presentadoras de antígenos
AQLQ	<i>Asthma Quality of Life Questionnaire</i>
ARIA	<i>Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDs	Células dendíticas
CD40L	Ligando de la molécula CD40
CD62L	Ligando de la molécula CD62
CTLA-4	Antígeno citotóxico de linfocitos T
CMB43	Proteínas que unen β -glucanos
CRD	Cuaderno de recogida de datos
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
Fc ϵ RI	Receptor de alta afinidad para la IgE
FEIA	Fluoroenzimoinmunoanálisis
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	<i>Forward Scatter</i>
f-MLP	N-formil-Metionina-Leucina-Phenilalanina
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i>
GITR	Receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides
HPB	Hiperreactividad bronquial
ICOS	Ligando inducible coestimulador (ICOS)
IgE	Inmunoglobulina E
IgG4	Inmunoglobulina G4
iTreg	Células T reguladoras inducidas o adaptativas
IFN γ	Interferón gamma
IL	Interleuquina
ITE	Inmunoterapia específica con alérgenos
LTP	Proteínas de transferencia de lípidos
MHC	Molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad
nTreg	Células T reguladoras naturales
NK	Células <i>Natural Killer</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud

SEAIC	Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica
PAF	Factor activador de plaquetas
PE	Ficoeritrina
PMA	Miristato-acetato de forbol
RIA	Radioinmunoanálisis
RQLQ	<i>Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire</i>
SD	Desviación estándar
SSC	Side Scatter
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
Th	Linfocitos T <i>helper</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Células Treg
Vs	<i>Versus</i>

INTRODUCCIÓN

Las reacciones alérgicas se producen como consecuencia de reacciones inmunitarias excesivas o incontroladas frente a antígenos inocuos, que provocan, en el caso de hipersensibilidad tipo I, la formación de moléculas de inmunoglobulinas del isotipo E (IgE) específicas del antígeno, que desencadenan daño tisular.

Desde un punto de vista clínico, abarcan un conjunto amplio de procesos: rinitis, asma alérgico, alergia alimentaria, eczema atópico, dermatitis, anafilaxia. Estos procesos ocasionan desde simples molestias hasta cuadros graves, que pueden poner en peligro la vida del paciente.

Además del factor de la gravedad clínica, hay que tener en cuenta que las enfermedades alérgicas afectan de manera importante a la calidad de vida de los individuos afectados, tanto en su faceta profesional como social, y que originan elevados costes sanitarios indirectos.

Actualmente, las reacciones alérgicas afectan a más del 30% de la población en los países industrializados ¹. Han pasado de ser enfermedades raras que sólo afectaban a la clase aristocrática, a constituir un problema de salud importante en muchas sociedades modernas. Este aumento en la prevalencia de las enfermedades alérgicas es un hecho evidente y contrastado en numerosos estudios epidemiológicos.

Los pólenes son responsables en gran parte de este aumento. En España, el 58% de los pacientes diagnosticados de rinitis alérgica y el 43% de los asmáticos están sensibilizados a polénes ^{2,3}. En la zona centro de nuestro país esta proporción es aún mayor ⁴.

El conocimiento de los mecanismos inmunológicos implicados en las enfermedades alérgicas, así como los que operan en las respuestas de los individuos no alérgicos y en las de los pacientes alérgicos tratados con inmunoterapia específica de alérgeno, contribuirá a un mejor control de los pacientes y al desarrollo de tratamientos más eficientes y más seguros.

I. ALERGIA AL POLEN O POLINOSIS

I.1. INTRODUCCIÓN

La primera definición científica de alergia al polen o polinosis fue realizada por el Dr. Bostock en 1819, cuando en el transcurso de una reunión en la Sociedad Médico-Quirúrgica de Londres comunicó sus propios síntomas, bajo el título “Un caso de afección periódica de ojos y pecho”⁵. A diferencia del resfriado común, los síntomas sólo aparecían durante la estación del heno en Inglaterra (junio-julio), por lo que la denominó fiebre del heno.

Tendrían que pasar más de cuatro décadas para que el Dr. Blackley descubriera de forma casual que la polinosis o fiebre del heno era provocada por la exposición ambiental a granos de polen de gramíneas⁶.

Aunque posteriormente se ha podido comprobar que otros pólenes pueden producir fiebre del heno, las gramíneas siguen siendo las que, globalmente, originan más casos de polinosis, debido a su amplia distribución (20% de la superficie vegetal de La Tierra) y a su gran alergenicidad⁷⁻¹⁰.

Actualmente, se entiende por polinosis, la inflamación de la mucosa nasal y/o conjuntival y/o bronquial causada por alérgenos contenidos en los granos de polen a través de un mecanismo mediado por IgE.

I.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La rinitis alérgica es el síntoma clínico que más frecuentemente se presenta en los pacientes polínicos. También puede aparecer asma en un porcentaje no despreciable de pacientes, dependiendo de la predisposición genética, pólenes implicados y grado de exposición.

Los síntomas originados por la alergia a pólenes son de carácter estacional. Aparecen durante la época de polinización de las especies vegetales productoras de pólenes alergénicos. En Europa, el período principal de polinización abarca

prácticamente medio año, desde la primavera hasta el otoño. Sin embargo, se ha visto que puede aparecer sintomatología característica de la polinosis fuera de la época de polinización, incluso cuando no se detectan granos de polen en los recuentos polínicos.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que además de los granos de polen, existen partículas alergénicas, que proceden de otras partes de las plantas (anteras) o del interior de los granos de polen, que se vehiculizan absorbidas en micropartículas, como las que proceden de la combustión de los motores diesel¹¹⁻¹³. La presencia atmosférica de estas partículas alergénicas durante de todo el año podría explicar la discordancia observada entre síntomas y recuentos de pólenes^{14,15}.

I.2.1 RINITIS

El término rinitis engloba un grupo heterogéneo de trastornos nasales que se caracterizan por la presencia de uno o más de los siguientes síntomas: estornudos, prurito nasal, rinorrea y obstrucción.

La clasificación etiológica de la rinitis se muestra en la Tabla I. De las causas no infecciosas, la rinitis alérgica es la más frecuente, y se considera una enfermedad multifactorial en cuyo desarrollo influyen tanto factores genéticos como ambientales. (Tabla II).

Frecuentemente, la rinitis alérgica se asocia a otras patologías como son la sinusitis, otitis, conjuntivitis o asma, debido, por una parte, a la relación anatómica y estructural que tiene con los respectivos órganos o estructuras afectadas, y por otra, a que la rinitis alérgica puede ser la expresión local de una enfermedad sistémica.

TABLA I. Clasificación de rinitis

Infeciosa
- Vírica
- Bacteriana
- Otros agentes infecciosos
Alérgica
- Intermitente
- Persistente
Ocupacional
- Intermitente
- Persistente

TABLA II. Rinitis alérgica.

Factores de riesgo

Factores en la infancia
Etnia
Exposición a alérgenos
Contaminantes
Clase social

Traducidas de guía ARIA

(*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*) 2008 ¹⁶.

I.2.2. ASMA

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias inferiores, que cursa con episodios recurrentes de obstrucción debidos a broncoespasmo, hipersecreción de moco y edema de la mucosa bronquial.

La obstrucción bronquial, que en la mayoría de casos es reversible de forma espontánea o con tratamiento, es responsable de los síntomas característicos del asma: tos, disnea, sibilancias, y opresión torácica. Ninguno de éstos es patognomónico. El diagnóstico se basa en la existencia de signos y síntomas junto con la demostración de la obstrucción reversible de las vías respiratorias inferiores y la existencia de inflamación bronquial.

La tendencia de las vías respiratorias a obstruirse o estrecharse demasiado y con facilidad, en respuesta a varios estímulos, ya sean físicos, químicos o inmunológicos se conoce con el término de hiperreactividad bronquial (HPB). Es una característica universal del asma, pero puede presentarse en otras entidades clínicas como en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

Existen una serie de factores de riesgo que influyen en el desarrollo del asma ¹⁷. Unos son factores que predisponen o protegen a los individuos a desarrollar asma, y otros son factores que actúan sobre individuos predispuestos, desencadenando la

aparición de asma. Los primeros incluyen (fundamentalmente genéticos) y los últimos (Tabla III).

TABLA III. Asma. Factores de riesgo.

Factores del Huésped
Factores genéticos
Obesidad
Sexo
Factores ambientales
Alérgenos
Infecciones (víricas fundamentalmente)
Tabaco
Contaminación
Dieta

Traducido

o de GINA (*Global Initiative for Asthma*) 2011 ¹⁷

I.2.3. VÍA AÉREA ÚNICA

Numerosos estudios epidemiológicos, fisiopatológicos y clínicos han constatado la interrelación existente entre la rinitis y el asma ^{18, 19}. Ambas enfermedades coexisten frecuentemente: el 70-90% de los pacientes con asma tienen rinitis, y el 19-38% de los pacientes con rinitis tienen asma. Ambas poseen una base inflamatoria que se caracteriza por infiltración celular y por la participación de diferentes mediadores proinflamatorios. Además, se ha visto que los tratamientos empleados en la rinitis pueden modular diferentes aspectos clínicos del asma, como los síntomas, la función pulmonar, el asma inducido por ejercicio y la hiperreactividad bronquial, y que cuando se exacerba la rinitis puede repercutir sobre la evolución y la gravedad del asma bronquial.

Todos estos hechos han originado la hipótesis de la vía aérea única, que sostiene que el asma y la rinitis son manifestaciones clínicas en diferentes órganos de un mismo proceso. Por tanto, cuando se considere el diagnóstico de rinitis o asma debe realizarse una evaluación tanto de las vías respiratorias superiores como inferiores.

I.3. EPIDEMIOLOGIA

La alergia respiratoria tiene gran importancia por su elevada prevalencia (la rinitis afecta a un 25.8% de la población mundial y el asma a un 18%²⁰), así como por su repercusión en la calidad de vida de los pacientes y por el impacto que tiene sobre la economía. Aunque el área geográfica influye sobre la etiología de la rinitis y el asma, el polen es siempre el agente causal más importante. En Europa, se estima que la prevalencia de la alergia al polen es superior al 40%¹.

Además es un hecho contrastado en numerosos estudios epidemiológicos que la prevalencia de las reacciones alérgicas ha sufrido un importante aumento en las últimas décadas. Esto también se observa en el caso de alergia al polen. En los países nórdicos, con una alta prevalencia de sensibilización a polen de abedul, la tasa de polinosis pasó del 4.4 % en 1971 al 8,4 % en 1981²¹; en Francia, la incidencia de rinitis alérgica aumentó del 3,8 % en 1968 al 10 % en 1982²²; y en Zurich, la progresión es también importante: 1,40 % en 1926, 4,28 % en 1958 y 10,2 % en 1986²³.

En España, en los años 1992 y 2005, se llevaron a cabo dos estudios de características similares impulsados por la Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica (SEAIC), en el que participaron alergólogos de todas las comunidades autónomas^{24,25}. Estos estudios, denominados respectivamente Alergológica 1992 y Alergológica 2005, tenían el objetivo de obtener información epidemiológica, clínica y socio-económica de los pacientes tratados en las consultas de Alergología de nuestro país. En Alergológica 2005 fueron evaluados 4991 pacientes. Un 55% padecían rinitis alérgica y un 28% asma. Los pólenes fueron los alérgenos más frecuentemente implicados, tanto en la rinitis (51%) como en el asma (43,8%).

En la zona centro de nuestro país, la prevalencia de polinosis es aún mayor, probablemente por la escasa humedad media del aire, que condiciona una mayor incidencia atmosférica de pólenes. En un estudio realizado en el año 1989 en Ciudad Real, de los 1.018 pacientes atendidos en la Sección de Alergia, el 28 % eran alérgicos a pólenes²⁶. En un estudio posterior, en el año 1997, también en Ciudad Real, se vio que el 87 % de los enfermos con rinitis y/o asma alérgico estaban sensibilizados a pólenes²⁷.

I.4. FISIOPATOLOGÍA DE LA INFLAMACIÓN ALÉRGICA

I.4.1. INTRODUCCIÓN

En las reacciones alérgicas, también conocidas como reacciones de hipersensibilidad, el sistema inmune responde de manera anómala ante sustancias aparentemente inocuas, resultando en un perjuicio para el organismo.

Según los mecanismos inmunológicos implicados, las manifestaciones alérgicas se clasifican en 4 tipos (Tabla IV). La mayoría pertenecen al tipo I, incluidas las enfermedades respiratorias alérgicas como la rinitis o el asma²⁸.

TABLA IV. Tipos de reacciones de hipersensibilidad

Tipo	Nombre	Mecanismo	Mediadores
I	Inmediata	IgE	Mastocitos y sus mediadores
II	Citotóxica	IgG o IgM	Opsonización y fagocitosis
IIa	Citotóxica	IgG o IgM	Citólisis
IIb	Citotóxica	IgG o IgM	Estimulación indirecta
III	Inmunocomplejos	IgG	Complemento y leucocitos
IVa	Retardada	Linfocitos Th	Citocinas
IVb	Retardada	Linfocitos Tc	Citotoxicidad

Las reacciones de hipersensibilidad tipo I se caracterizan por la presencia de moléculas IgE específica a alérgenos comunes. Se acepta que la base inmunológica de estas enfermedades alérgicas está en un predominio en la respuesta de los linfocitos T *helper* 2 (Th2), porque estas células además de mediar la síntesis de IgE vía interleucina 4 (IL-4), juegan un papel importante, vía IL-5, en la inflamación eosinofílica que caracteriza a las enfermedades alérgicas y pueden producir además HPB vía IL-9 y IL-13²⁹⁻³².

Sin embargo, aunque la gran mayoría de estudios sugiere un papel central a los linfocitos Th2 en la patogénesis de las enfermedades alérgicas respiratorias, algunos estudios apuntan a que otras poblaciones celulares, como los linfocitos T *helper* 1 (Th1)³³, las células *natural killer* (NK)^{34,35} y las células T *helper* 17 (Th17), pueden estar implicadas³⁶⁻³⁸.

Además de estas células Th con función efectora, parece demostrado que en la sensibilización alérgica intervienen otras células T con propiedades inmunorreguladoras, que se conocen como células T reguladoras (Treg). Estas células se encargan de mantener la integridad del organismo aboliendo las respuestas inmunes excesivas que pudieran resultar en enfermedades autoinmunes, así como manteniendo un estado de tolerancia frente a sustancias inocuas, como los alérgenos³⁹. Parece que su actividad supresora puede no ser totalmente efectiva en los pacientes alérgicos^{40,41}.

I.4.2. LINFOCITOS T *HELPER*

Los linfocitos T *helper* expresan como correceptor la molécula CD4, la cuál es necesaria para interactuar con las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase II, por eso se les conoce como linfocitos T CD4. Estos linfocitos sólo reconocen a sus antígenos específicos cuando le son presentados unidos a las moléculas MHC (glucoproteínas especializadas en la presentación de antígenos).

El término *helper* se les acuñó porque su función general consiste en secretar citocinas que activan a otras células del sistema inmunitario, o lo que es lo mismo, ayudan a otras células a cumplir sus funciones efectoras.

Los linfocitos Th1, por su parte, liberan principalmente interferón gamma (IFN- γ) e IL-2, y a través de estos mediadores principalmente protegen contra infecciones de patógenos intracelulares, debido a la habilidad de las citocinas Th1 para activar a fagocitos y aumentar la respuesta celular. En contraste, las células Th2 liberan principalmente IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, citocinas implicadas en la supervivencia de eosinófilos (IL-5), en la producción por parte de linfocitos B de grandes cantidades de anticuerpos, incluyendo la IgE (IL-4 e IL-13), así como en el crecimiento y en la degranulación de mastocitos y basófilos (IL-4 e IL-9)⁴².

Aunque la mayor parte de las respuestas inmunitarias adaptativas involucran la contribución de las células Th1 y Th2, hay circunstancias en las que predomina la respuesta Th1 o la respuesta Th2, como en el caso de las enfermedades alérgicas, en las que predomina la respuesta Th2.

Por otro lado, mientras que la IL-4 inhibe el desarrollo de los linfocitos Th1, el IFN- γ inhibe el desarrollo de linfocitos Th2. Es decir, las células Th1 y Th2 muestran un efecto antagonista mutuo en el desarrollo del otro subtipo ⁴³. Así, una vez que la respuesta de las células T CD4 desarrolla una tendencia, dicha tendencia puede reforzarse.

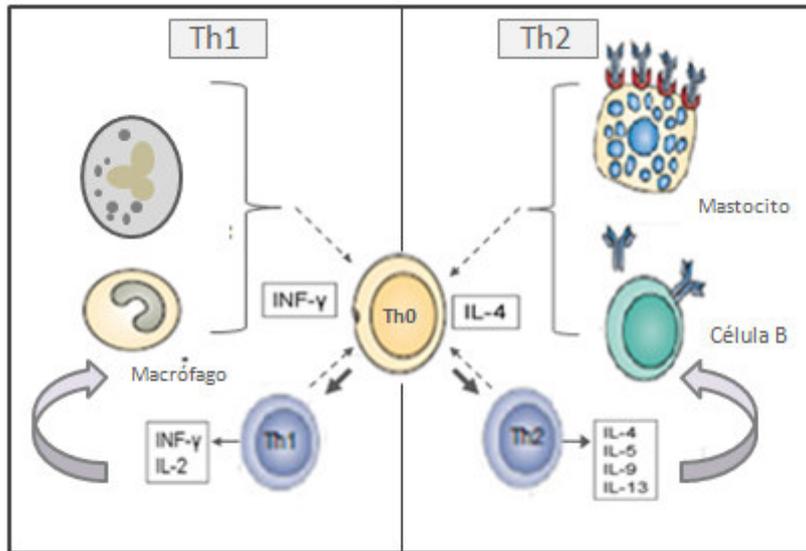


FIGURA I. Diferenciación de linfocitos Th1 y Th2 a partir de células Th0.

I.4.3. COOPERACIÓN T- B

La síntesis y secreción de moléculas de anticuerpos por parte de los linfocitos B requiere la cooperación de los linfocitos TCD4 *helper* ⁴⁴. Estos linfocitos CD4 expresan el ligando del CD40 (CD40L) que se une a CD40, una molécula de membrana presente en células B. La supervivencia de las células B que reconocen el antígeno depende de que sus moléculas de CD40 se unan a su ligando expresado por los linfocitos T cooperadores. Los linfocitos B estimulados por el antígeno y rescatados de la apoptosis por la señal transmitida a través de CD40, proliferan activamente y sufren mutaciones somáticas que posibilitan la selección de los linfocitos B con mayor afinidad por el antígeno.

Además bajo la influencia de las citocinas liberadas por los linfocitos TCD4, los linfocitos B pueden sufrir la recombinación de cambio de clase ⁴⁵, es decir, las células B en desarrollo pueden experimentar reordenamientos génicos que les permitan secretar

distintos anticuerpos con la misma especificidad para el antígeno pero de diferentes isotipos y por tanto, con funciones efectoras distintas. Por ejemplo, bajo la influencia de la IL-4 e IL-13, los clones expandidos pueden diferenciarse y madurar como células que secretan IgE.

I.4.4. CÉLULAS TREG

Las células Treg forman una familia heterogénea. En términos generales, se han clasificado en Treg naturales (nTreg) y en Treg inducidas o adaptativas (iTreg).

Las nTreg se producen en el timo, y expresan constitutivamente la cadena α del receptor de IL-2 (CD25) en altas concentraciones. Sin embargo no es un marcador específico, ya que este marcador lo expresan todas las células T activadas. Otros marcadores de las nTreg son el receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (GITR), el antígeno citotóxico de linfocitos T (CTLA-4), el ligando de la molécula CD62 (CD62L), CD103 y neurofilina⁴⁶⁻⁴⁹, pero estos marcadores tampoco son específicos de las nTreg, se expresan en otras células T activadas. El único marcador que parece ser específico de las Tregs en general, es el factor de transcripción Foxp3. Además se ha visto que el fenotipo supresor de las Tregs se debe en gran medida a la expresión de este factor de transcripción⁵⁰⁻⁵². Los pacientes con mutaciones en el gen que codifica Foxp3 desarrollan un síndrome conocido como síndrome IPEX⁵³ (inmunodisregulación, poliendocrinopatía, enteropatía, síndrome ligado al cromosoma X). Está asociado con un aumento en la incidencia no sólo de enfermedades endocrinas autoinmunes sino también de manifestaciones alérgicas, como eczema severo, aumento en los niveles séricos de IgE, eosinofilia y alergia alimentaria.

Las células Tregs que secretan grandes cantidades de IL-10 y TGF- β (iTreg) proceden de células T vírgenes y se originan en los tejidos periféricos. Se ha visto también que estas células Treg pueden proceder de linfocitos Th totalmente diferenciados (Th1 y Th2) en condiciones de estimulación crónica, pero las células iTreg secretan sólo IL-10 y TGF- β , sin otras citoquinas características de Th1 o Th2.

Las iTregs producen niveles altos de IL-10 y TGF- β , bajos niveles de IFN- γ e IL-2, e indetectables niveles de IL-4⁵⁴. Estas células no expresan constitutivamente

Foxp3, pero tras su activación, pueden expresar niveles de Foxp3 similares a las nTreg⁵⁵.

I.4.5. MECANISMOS DE LA INFLAMACIÓN ALÉRGICA.

Las reacciones mediadas por anticuerpos IgE pueden dividirse en dos fases principales: (i) fase de sensibilización y memoria, y (ii) fase efectora, que a su vez puede subdividirse en respuesta inmediata y respuesta tardía.

I.4.5.1. FASE DE SENSIBILIZACIÓN

La fase de sensibilización en las enfermedades alérgicas comienza cuando los alérgenos superan las barreras anatomofisiológicas, como son piel, mucosas, movimiento ciliar, moco y moléculas microbicidas, y entran en contacto con las células de la inmunidad innata: neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células NK, células dendríticas (CDs), mastocitos y células endoteliales. Algunas de estas células pueden actuar como células presentadoras de antígenos (APC): pueden internalizar al alérgeno, degradarlo enzimáticamente y colocar partes del mismo en la superficie celular unidos a moléculas de MHC.

En las personas alérgicas, el encuentro de estas células con linfocitos T CD4 en los órganos linfoides secundarios, origina la diferenciación y expansión clonal de linfocitos Th2 CD4+ específicos del alérgeno.

Las citoquinas liberadas por estas células son responsables de las manifestaciones alérgicas. Como ya se ha comentado, las interleuinas IL-4 e IL-13 son esenciales para inducir a los linfocitos B a producir anticuerpos del isotipo IgE específicos de alérgeno, la IL-5 contribuye a la inflamación eosinofílica y la IL-9 y IL-13 son importantes en la HPB²⁹⁻³².

Los anticuerpos IgE formados penetran en la circulación e infiltran los tejidos, incluyendo las vías respiratorias. Aquí pueden unirse a sus receptores de alta afinidad (FcεRI) sobre la superficie de células, como mastocitos y basófilos, conduciendo así a la sensibilización del paciente^{56,57}. Además, se genera durante esta fase un pool de

células de memoria T y B específicas de alérgeno.

I.4.5.2. FASE EFECTORA

La fase efectora se inicia tras un nuevo encuentro con el alérgeno, el cual se une a los complejos IgE-FcεRI sobre los basófilos y mastocitos sensibilizados, provocando su degranulación. Además de la liberación de los mediadores inflamatorios preformados, como histamina y triptasa, esta unión también resulta en la síntesis y en la liberación de nuevos mediadores lipídicos, como el leucotrieno C4 y prostaglandina D2, y en la transcripción de numerosas citoquinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF)^{58,59}. Los síntomas característicos de las reacciones alérgicas se atribuyen a la liberación de estos mediadores: edema respiratorio, broncoconstricción, aumento de la secreción de moco, rinorrea, etc⁶⁰.

Algunas de las sustancias liberadas por los mastocitos son quimioatrayentes, y estimulan el influjo, unas horas después del encuentro con el alérgeno, de otras células inflamatorias, como eosinófilos, neutrófilos, basófilos y linfocitos⁶¹.

Los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, manteniendo así los niveles de IgE específicas al antígeno. Los eosinófilos, como los mastocitos, contienen una gran variedad de mediadores preformados, y sintetizan también mediadores lipídicos como el leucotrieno C4 y el factor activador de plaquetas (PAF), y citoquinas como el TNF, TGFβ e IL-5. Todos estos mediadores, son responsables de la fase tardía de la fase efectora, que se inicia unas horas después del contacto con el alérgeno, y que provocan las manifestaciones clínicas más severas de las reacciones alérgicas, como el asma crónico, rinitis alérgica, dermatitis atópica, y en casos extremos, las reacciones anafilácticas^{62,63}.

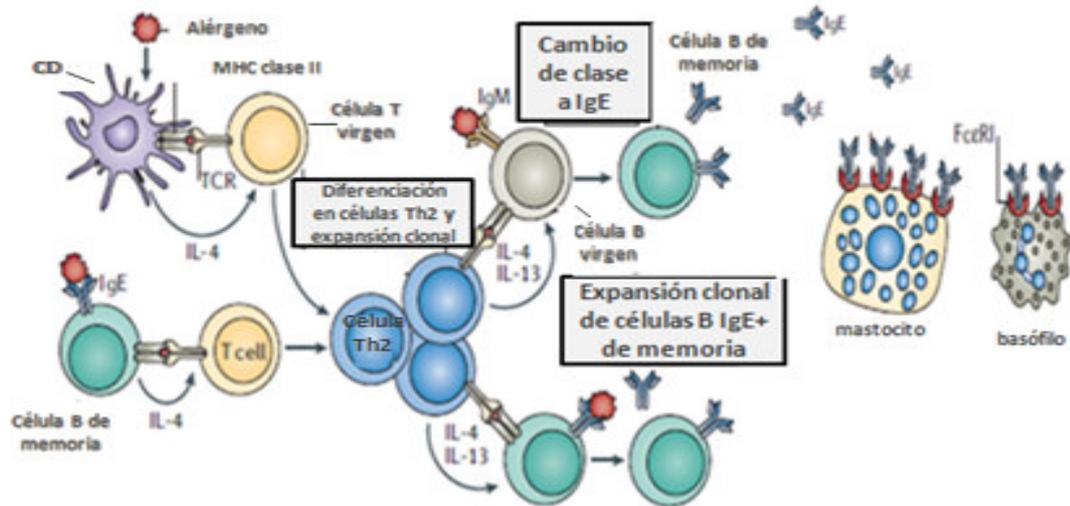


FIGURA II. Fases de la enfermedad alérgica (Modificada de Larché et al ⁸⁸). En individuos predispuestos, la exposición inicial al antígeno lleva a la activación de células Th2 específicas del alérgeno y a la síntesis de IgE por parte de los linfocitos B, lo que se conoce como sensibilización alérgica. Estas moléculas de IgE se unen a sus receptores sobre basófilos y mastocitos. En posteriores encuentros con el alérgeno, la unión de éste a las moléculas de IgE sobre la superficie de células inflamatorias, provoca la liberación de mediadores, que son los responsables de los síntomas característicos de la alergia.

I.4.6. PAPEL DE LAS CDs EN LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA TH1 O TH2

Las CDs han sido ampliamente estudiadas porque pueden influir en el fenotipo Th que se desarrolle en las repuestas inmunológicas.

Se ha propuesto que la expresión diferencial de las moléculas de superficie de las CDs influye en el balance Th1/Th2 ^{64,65}. Por ejemplo, CD86 parece ser más importante que CD80 para la inducción de una respuesta Th2 ⁶⁶. De forma similar, la expresión del ligando OX40 ⁶⁷ y el ligando inducible coestimulador (ICOS) en las CDs favorece la diferenciación Th2 ^{68,69}.

Entre los factores solubles que influyen en el balance Th1/Th2, la IL-12 parece ser la responsable del inicio y el mantenimiento de una respuesta Th1 ⁷⁰. La síntesis de esta interleucina por parte de macrófagos y CDs puede ser inducida por varios estímulos microbianos, así como por células T activadas que expresan el ligando CD40L ⁷¹.

Las CDs también producen otros factores que inducen la respuesta Th1, como la IL-18 y la IL-23⁷², aunque la importancia de estas moléculas comparada con la IL-12, tiene que ser determinada.

Además de las citoquinas liberadas, también es importante la calidad de la interacción CDs-célula T. Interacciones cortas del péptido unido a la molécula de MHC con el receptor de las células T favorece la respuesta Th1 mientras que interacciones más largas programan a la célula para que se diferencie en Th2⁷³.

I.4.7. CÉLULAS TREG Y ALERGIA

Las células Treg pueden controlar y modificar el desarrollo de las enfermedades alérgicas actuando tanto sobre la fase de sensibilización como sobre la fase efectora de las reacciones alérgicas.

Por un lado, pueden modificar la capacidad de las CDs para activar a las células T⁷⁴. Además, las Treg inhiben directamente la activación de las células Th2 específicas de alérgeno, minimizando la producción de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-9⁷⁵. Las Treg pueden suprimir también la inflamación alérgica actuando directamente sobre mastocitos, basófilos y eosinófilos⁷⁶, así como sobre las células B, suprimiendo la producción de IgE específica del alérgeno e induciendo la producción de moléculas de inmunoglobulina IgG4⁷⁷.

Para llevar a cabo todas estas funciones, las Treg emplean una amplia gama de factores solubles y de moléculas de superficie, como la IL-10, TGF- β , CTLA-4 o el receptor de histamina 2^{78,79}.

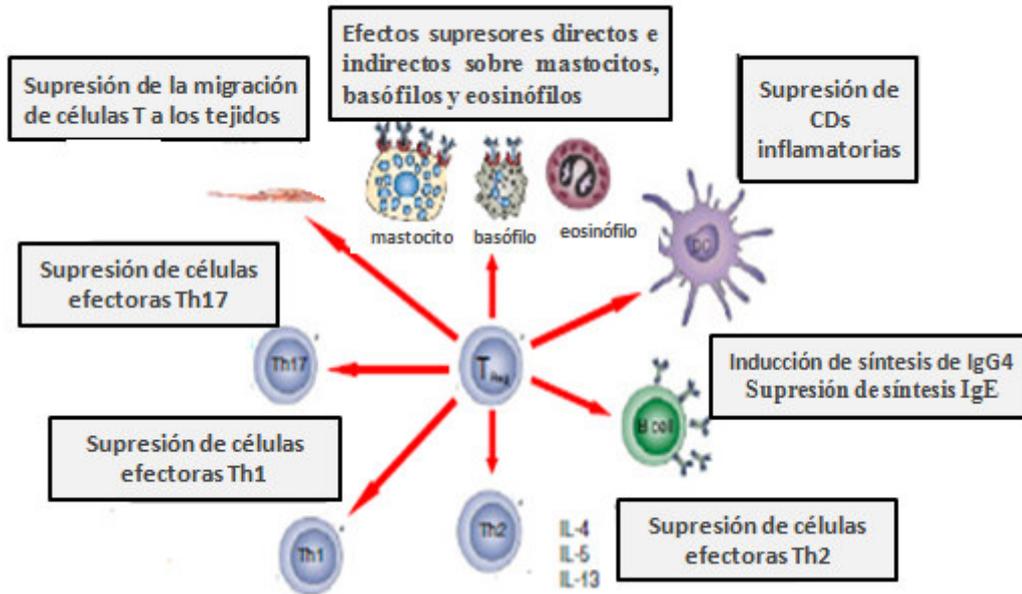


FIGURA III. Papel de las células Treg en las enfermedades alérgicas. Las células Treg pueden suprimir las respuestas alérgicas Th2 y contribuir al control de las enfermedades alérgicas de varias formas. Las flechas rojas indican los efectos que, directamente o indirectamente, ejercen las células Treg sobre células efectoras (basófilos, eosinófilos, mastocitos), CD_s, células B, y células Th1, Th2 y Th17.

Teniendo en cuenta el importante papel que juegan las células Treg en control de las enfermedades alérgicas, se ha propuesto que una posible explicación para el desarrollo de las reacciones alérgicas es que la actividad de las células Treg sea defectuosa.

I.5. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN LA ALERGIA AL POLEN

I.5.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Como en cualquier otra enfermedad, para hacer el diagnóstico clínico de polinosis es fundamental realizar una buena historia clínica. La anamnesis constituye un pilar fundamental en el diagnóstico alergológico. Deber ser minuciosa y, en general, debe seguir los principios especificados en la tabla V.

Tabla V Principios generales de la anamnesis alergológica.

Historia familiar Antecedentes familiares de alergia	Factores ambientales Vivienda: tipo, antigüedad, localización, ventilación, calefacción. Fumadores en domicilio
Enfermedad actual Síntomas Edad de comienzo Frecuencia y duración de los síntomas Evolución de la enfermedad Impacto vital	Factores agravantes de los síntomas Infecciones respiratorias Exposición a neumoalérgenos Exposición a irritantes Ejercicio Fármacos Factores emocionales.
Características de los síntomas Variación circadiana Perennes, estacionales Continuos, episódicos	Hábitat del paciente Lugar habitual de residencia (urbano o rural) Convivencia con animales domésticos Ambiente laboral Aficiones

Si la anamnesis sugiere la presencia de procesos característicos de la alergia al polen, como la rinitis o el asma, se deben realizar pruebas funcionales para confirmar el diagnóstico. Además, para comprobar la implicación de alérgenos polínicos en estos procesos, es necesario realizar un diagnóstico alergológico mediante pruebas *in vivo* e *in vitro*.

I.5.2. PRUEBAS FUNCIONALES

En todo paciente en el que se sospeche asma, debe realizarse una prueba de función respiratoria para confirmar el diagnóstico. Se debe comprobar que existe obstrucción al flujo aéreo: para ello, la técnica más utilizada por su sencillez y coste es

la espirometría. Existen otras técnicas, como la dilución de gases, la pletismografía o chaleco insuflable de mayor complejidad, que se reservan para casos especiales (por ejemplo, en niños que no cooperan en este tipo de pruebas).

En el asma, además de demostrar la limitación al flujo aéreo, hay que demostrar también que la obstrucción bronquial es reversible y/o que existe cierto grado de HPB. Para ello, se utilizan pruebas broncodinámicas, como el test de broncodilatación y los tests de HPB inespecífica.

Para confirmar el diagnóstico de rinitis también existen varias pruebas funcionales (rinomanometría anterior activa, medición de los flujos inspiratorios nasales y la rinometría acústica) que permiten estudiar la inflamación nasal característica. Sin embargo, el diagnóstico de rinitis alérgica se realiza habitualmente mediante la historia clínica, la exploración física y un número limitado de pruebas cutáneas para confirmar/excluir una etiología alérgica; las pruebas de provocación sólo se realizan cuando hay discordancia entre la historia clínica y las pruebas cutáneas.

I.5.3. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS IN VIVO

Las técnicas *in vivo* se pueden definir como aquellas que se realizan en el propio paciente, bien sea con el fin de determinar el alérgeno implicado en el desarrollo de la enfermedad, o de confirmar la sospecha del alérgeno desencadenante, puesta de manifiesto en la historia clínica. Entre las pruebas *in vivo* destacan las pruebas cutáneas.

I.5.3.1. PRUEBAS CUTÁNEAS

Las pruebas cutáneas consisten en la reproducción de una reacción de hipersensibilidad de tipo inmediato, mediante la introducción en la piel de una pequeña cantidad de un extracto del alérgeno sospechoso de producir los síntomas alérgicos.

La reacción producida es el resultado de la interacción de anticuerpos de la clase IgE con el alérgeno inoculado. Estos anticuerpos, formados previamente tras la exposición al alérgeno, están unidos a sus receptores específicos (FcεRI), situados en la superficie de los mastocitos cutáneos. La interacción conduce a una rápida liberación

no citolítica, en 15 a 20 minutos, de histamina, leucotrienos y otros mediadores, los cuales muestran en la piel su acción característica, desarrollando una pápula, es decir, un área edematosa de bordes bien definidos, rodeada de una zona eritematosa peor definida.

Genéricamente, se acepta que existen dos métodos válidos para la realización de pruebas cutáneas de lectura inmediata que son útiles para el diagnóstico de enfermedades mediadas por IgE. La metodología más difundida es la conocida como *prick test*, en la que el alérgeno es colocado sobre la superficie de la piel (los mejores resultados se obtienen sobre la cara anterior del antebrazo) y posteriormente se introduce, con la ayuda de una lanceta, en la epidermis. En el segundo método, el alérgeno es inyectado en la dermis con una jeringa y se le conoce como intradermorreacción.

La metodología de *prick test* tiene limitaciones porque la baja potencia de los extractos puede inducir falsos negativos ⁸⁰. Sin embargo, si se utilizan alérgenos estandarizados y potentes, esta técnica tiene ventajas respecto a la intradermorreacción (Tabla VI).

TABLA VI. Comparación entre pruebas cutáneas

	Prick test	Intradermorreacción
Facilidad de ejecución		++
Rapidez de ejecución	++++	++
Posibilidad de probar alérgenos simultáneamente	+++	-
Falsos positivos	Raros	Posibles
Falsos negativos	Posibles	Raras
Reproducibilidad	+++	++++
Seguridad	++++	++
Tolerabilidad en niños	Si	Muy molesto

Modificado de Demoly et al ⁸¹

I.5.4. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS IN VITRO

Desde el punto de vista del laboratorio, existen dos tipos de tests útiles en el diagnóstico de las enfermedades alérgicas: inmunológicos y de inflamación. De ellos, los que presentan mayor fiabilidad y precisión en el cribado y diagnóstico de los procesos alérgicos son los inmunológicos. Dentro de éstos, los más utilizados son los basados en la determinación de IgE.

I.5.4.1. IgE TOTAL

La determinación de IgE total consiste en la cuantificación en sangre de la concentración de IgE. Se lleva a cabo por diversos métodos de inmunoanálisis, que han conseguido desplazar a las técnicas isotópicas de radioinmunoanálisis (RIA), ya que en la práctica son igual de eficaces con la ventaja de no precisar isótopos radioactivos.

Sin embargo, la cuantificación de IgE total tiene un valor limitado como método de cribado para las enfermedades alérgicas. Las principales limitaciones que presentan siguen siendo su concentración dependiente de la edad y la superposición de las concentraciones séricas entre poblaciones atópicas y no atópicas, de tal manera que un paciente atópico puede tener niveles normales de IgE sérica total y viceversa.

I.5.4.2. IgE ESPECÍFICA

La determinación de IgE frente a alérgenos específicos consiste en cuantificar en sangre los niveles de IgE que reconocen específicamente a un alérgeno determinado. Es la prueba de laboratorio que presenta los mejores valores predictivos y los valores de sensibilidad y especificidad más adecuados para el diagnóstico de procesos alérgicos.

En un estudio multicéntrico que incluyó a población adulta y pediátrica de varios países europeos, se encontraron valores de sensibilidad y especificidad por encima del 95%⁸². Los valores predictivos fueron elevados, especialmente los negativos, en torno al 95% en la población pediátrica. Otros estudios han arrojado resultados similares⁸³⁻⁸⁴.

El primer método empleado para su determinación fue el Radio-Alergo-Sorbent

Test (RAST), y aunque en estos momentos existen otros muchos, sigue siendo el método de referencia. Los actuales métodos son variantes del enzimoimmunoensayo; el más utilizado en nuestro medio es el UniCAP, que es un fluoroenzimoimmunoensayo.

I.5.4.3. TEST DE ACTIVACIÓN DE BASÓFILOS

Los basófilos de sangre periférica, junto con los mastocitos tisulares, constituyen las células efectoras primarias de las reacciones inmediatas mediadas por IgE.

El test de activación de basófilos se basa en la capacidad que presentan estas células para liberar el contenido de sus gránulos tras la incubación con el correspondiente alérgeno específico. La degranulación provoca la fusión de la membrana de los gránulos con la membrana plasmática, con lo que las moléculas presentes en la membrana de los gránulos, como el CD63, se expresan en la membrana del basófilo activado⁸⁵. La expresión de estos marcadores de superficie permite utilizar la citometría de flujo para cuantificar el tanto por ciento de basófilos que se activan tras la estimulación con el antígeno.

La correlación de los resultados del test de activación de basófilos con los niveles de IgE sérica específica y las pruebas cutáneas es muy buena para ácaros⁸⁵, pólenes⁸⁶ y otros alérgenos. Sin embargo, hay pocos datos sobre el rendimiento de la técnica en la monitorización de la inmunoterapia específica con alérgenos (ITE).

I.6. TRATAMIENTO

El tratamiento de las enfermedades alérgicas se basa en primer lugar en la evitación del alérgeno. Sin embargo, en la alergia a pólenes, las medidas de evitación suelen ser insuficientes, al no poder evitar la inhalación de estas partículas atmosféricas con el aire que respiramos. Por este motivo, la mayoría de los pacientes precisan tratamiento farmacológico. Sin embargo, estos tratamientos no tienen efecto a largo plazo, por lo que el paciente se ve obligado a mantener esta medicación durante toda la época de polinización. Las limitaciones del tratamiento farmacológico llevan a la búsqueda de tratamientos más eficaces y definitivos, como la ITE.

I.6.1. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

El objetivo principal del tratamiento farmacológico es lograr y mantener el control de la enfermedad lo antes posible, controlando los síntomas diarios y previniendo las exacerbaciones. Para conseguirlo, el tratamiento farmacológico debe ser individualizado y ajustarse a cada paciente, así como evaluarse periódicamente.

Para alcanzar el control terapéutico del asma, se establecen varios escalones terapéuticos (figura IV) ⁸⁷. Es decir, si el asma no se encontrara bien controlado, el tratamiento debe aumentarse en los escalones terapéuticos que sean necesarios para lograr el control. Si el asma ha estado controlado durante al menos tres meses, el tratamiento de mantenimiento puede reducirse paulatinamente con el fin alcanzar las necesidades terapéuticas mínimas que son necesarias para mantener el control.

	Escalón 1	Escalón 2	Escalón 3	Escalón 4	Escalón 5	Escalón 6
Tratamiento de mantenimiento	De elección	Glucocorticoide inhalado a dosis bajas	Glucocorticoide inhalado a dosis bajas+ agonista β_2 de acción larga	Glucocorticoide inhalado a dosis bajas+ agonista β_2 de acción larga	Glucocorticoide inhalado a dosis medias+ agonista β_2 de acción larga	Glucocorticoide inhalado a dosis altas+ agonista β_2 de acción larga+glucocorticoides inhalados
	Otras opciones	Antileucotrieno	Glucocorticoide inhalado a dosis bajas Glucocorticoide inhalado a dosis bajas + antileucotrieno	Glucocorticoide inhalado a dosis medias + antileucotrieno	Añadir Antileucotrieno y/o teofilina y/o omalizumab	Añadir Antileucotrieno y/o teofilina y/o omalizumab
	A demanda	Agonista β_2 adrenérgico de acción corta	Agonista β_2 adrenérgico de acción corta	Agonista β_2 adrenérgico de acción corta	Agonista β_2 adrenérgico de acción corta	Agonista β_2 adrenérgico de acción corta

FIGURA IV. Escalones terapéuticos del tratamiento de mantenimiento del asma del adulto.

Los fármacos para tratar el asma se clasifican como de control o mantenimiento y de alivio, también llamados “de rescate”. Los medicamentos de control o mantenimiento, que deben administrarse a diario durante periodos prolongados, incluyen glucocorticoides inhalados o sistémicos, antagonistas de los leucotrienos, agonistas β_2 adrenérgicos de acción larga, teofilina de liberación retardada y anticuerpos monoclonales anti-IgE (omalizumab). Las cromonas han caído en desuso por su menor eficacia. Los medicamentos de alivio se utilizan a demanda para tratar o prevenir la broncoconstricción de forma rápida, y entre ellos se encuentran los agonistas β_2 adrenérgicos de acción corta inhalados (de elección) y los anticolinérgicos inhalados (bromuro de ipratropio).

El tratamiento farmacológico de la rinitis alérgica se establece de manera escalonada según la gravedad (figura V).

Intermitente leve	Intermitente moderada-grave/persistente leve	Persistente moderada-grave
Antihistamínico oral o intranasal y/o descongestionante o antileucotrienos	Antihistamínico oral o intranasal y/o descongestionante o glucocorticoide intranasal o antileucotrienos	Glucocorticoide intranasal o Antihistamínico oral o antileucotrienos

FIGURA V. Abordaje terapéutico de la rinitis alérgica.

I.6.2. ITE

La ITE o vacunación con alérgenos se basa en la administración de dosis progresivamente crecientes de un alérgeno, con el objetivo de modificar la respuesta inmunológica y clínica al mismo, y por lo tanto, de reducir o eliminar los síntomas asociados con la exposición posterior al alérgeno causante.

La ITE, junto con las medidas de control ambiental, son las únicas formas de tratamiento etiológico de la alergia respiratoria, pero sólo la ITE es capaz de modificar la historia natural de la enfermedad alérgica, impidiendo la progresión de la misma hacia asma en los pacientes con rinitis.

I.6.2.1. MECANISMOS INMUNOLÓGICOS DE LA ITE

Los mecanismos por los cuales la ITE media sus efectos antiinflamatorios siguen sin estar completamente definidos. Esto se debe en parte a las diferencias en los protocolos de tratamiento y a la distinta composición de los extractos alérgicos que se han utilizado en los distintos estudios que se han realizado. Sin embargo, en todos ellos se ha observado que la ITE modifica la respuesta de las células T y de las células B, así como el número y la función de las células efectoras que intervienen en las reacciones alérgicas⁸⁸. Básicamente, la ITE reeduca al sistema inmunitario de manera que lo hace tolerante frente al alérgeno implicado.

I.6.2.1.1. EFECTO SOBRE CÉLULAS T

En los pacientes tratados con ITE, se observa una disminución en la respuesta proliferativa de los linfocitos T, lo que es consistente con la anergia y/o delección de células T específicas de alérgeno⁸⁹. Se ha sugerido que las altas dosis empleadas en la vacunación, en comparación con las que se encuentran en la naturaleza, podrían ser las responsables de esta falta de respuesta por parte de los linfocitos T⁹⁰.

Además, se ha visto que las altas dosis empleadas en la ITE pueden disparar la apoptosis de los linfocitos Th2⁹¹ y promover la expansión de células T productoras de IFN- γ , provocando la desviación inmune del fenotipo Th2, predominante en los pacientes alérgicos y responsables de la producción de IgE, hacia el fenotipo Th1 (inmunodesviación)⁹². Se ha comprobado que estos procesos ocurren tanto a nivel local como a nivel sistémico.

Por otro lado, la ITE aumenta la proporción de células Treg no específicas del alérgeno⁹³, por lo que estas células y las citoquinas que secretan deben tener algún papel en el éxito de la terapia. De hecho, algunos autores consideran que el aumento de actividad de las Treg es el principal o incluso el único mecanismo que explica la eficacia clínica de la ITE.

Las células Treg se caracterizan por la producción de IL-10 y TGF- β . La IL-10 liberada por las Treg inhibe la expresión de MHC de clase II en las APC, así como la

fosforilación de la molécula co-estimuladora CD28 en las células T, previniendo posteriores cascadas de señalización⁹⁴. También actúa sobre las citoquinas liberadas por los linfocitos Th1 y Th2, e induce anergia de células T efectoras^{95,96}. Además, el aumento de IgG4, anticuerpo que compite con la IgE en su unión a células efectoras, está directamente relacionado con el aumento de IL-10⁹⁷.

Por su parte, el TGF- β puede, al igual que la IL-10, regular la presentación del antígeno, la expresión de moléculas coestimuladores y la proliferación de las células T. Además, está implicada en el aumento de IgA que se observa tras el tratamiento con ITE⁹⁸.

En resumen, las respuestas Th2 alérgico específicas están bajo el control de las citoquinas Th1 y de citoquinas inmunosupresoras (IL-10, TGF- β), las cuales son producidas en respuesta a la estimulación repetida del sistema inmune. Por eso, y aunque en la última década, los mecanismos de inmunodesviación de la respuesta hacia Th1 y la inmunoregulación inducidos por la ITE se habían presentados como mecanismos alternativos y excluyentes, en los últimos años, se ha comprobado que el éxito de la ITE es consecuencia de ambos mecanismos.

I.6.2.1.2. EFECTO SOBRE CÉLULAS B

Al contrario de lo que ocurre con las células T, no hay evidencia de que la ITE induzca tolerancia por parte de las células B⁹⁹.

La ITE parece tener poco efecto sobre los niveles séricos de IgE, los cuales se elevan inicialmente tras el comienzo de la ITE, aunque decrecen a niveles de pretratamiento durante la fase de mantenimiento¹⁰⁰. Más clara es la aparición después de la ITE de anticuerpos de la subclase IgG, y en concreto de los subtipos IgG4 e IgG1, cuyos niveles séricos aumentan de 10 a 100 veces tras el inicio del tratamiento¹⁰¹⁻¹⁰³.

El subtipo IgG4 presenta marcadas características antiinflamatorias: no induce la cascada del complemento y es capaz de inhibir la formación de complejos inmunes con otras IgG. Además parece que actúa como un anticuerpo con actividad bloqueadora, compitiendo con la IgE en la unión a mastocitos, basófilos y otras células, con la

consiguiente inhibición de la liberación de histamina ^{104,105}. También interviene en la presentación del antígeno a los linfocitos T, impidiendo la unión del complejo IgE-antígeno a la CPA.

El isotipo de Ig que secretan los linfocitos B viene determinado por las citoquinas producidas por los linfocitos Th y por las CDs. De la misma forma que la IL-4 y la IL-13 secretadas por los linfocitos Th2 aumentan la síntesis de IgE por parte de los linfocitos B, se ha visto que la citoquina reguladora IL-10 secretada por células reguladoras, está implicada en el aumento de IgG4 que se observa tras ITE ¹⁰⁶⁻¹⁰⁷. De esta manera, la disminución del ratio IgE/IgG4 durante el tratamiento, puede reflejar el cambio del predominio de los linfocitos Th2 al de las células reguladoras.

Además de la IgG, diversos estudios han puesto de manifiesto el aumento en la producción de IgA después de la vacunación, indicando que otros anticuerpos pueden contribuir a la eficacia clínica de la misma ¹⁰⁸. El aumento de la IgA se atribuye a efecto de TGF- β .

I.6.2.1.3. EFECTO SOBRE CÉLULAS EFECTORAS

Se ha comprobado que la ITE modula también la activación de mastocitos y basófilos y disminuye la liberación de histamina mediada por IgE ¹⁰⁹. La disminución en la degranulación in vitro de los basófilos ocurre mucho antes que el descenso significativo de los niveles de IgE y de la reactividad de los test cutáneos.

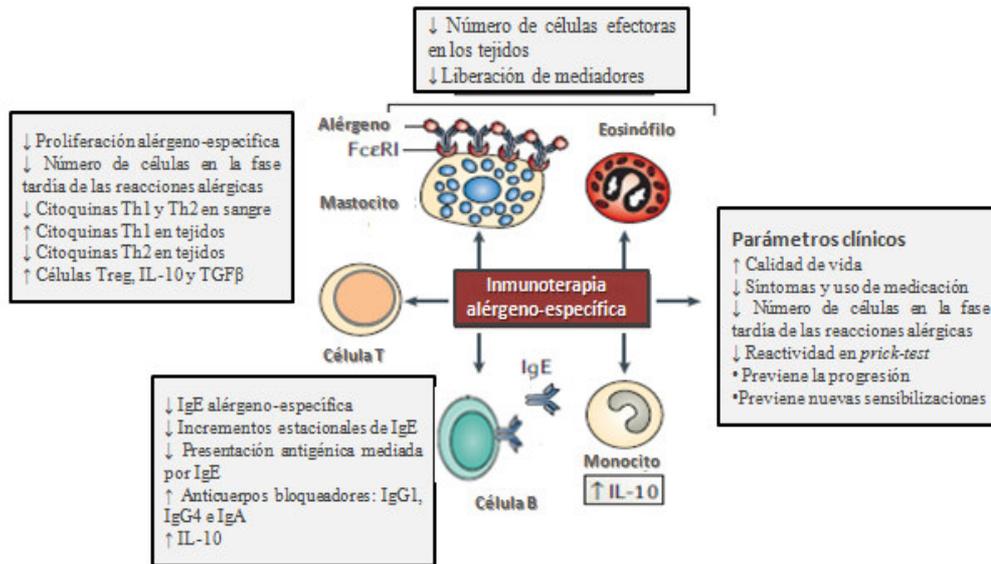


FIGURA VI. Efectos de las ITE sobre parámetros clínicos e inmunológicos (Modificada de Larché et al ⁸⁸)

También en estos mecanismos parecen estar implicadas las células con propiedades reguladoras ¹¹⁰. La IL-10 inhibe la activación dependiente de IgE de los mastocitos y suprime la producción de IL-5 por los linfocitos Th. Además, inhibe la expresión de CD40 en los eosinófilos activados, aumentando la muerte celular ¹¹¹.

1.6.2.2. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

La vía de administración habitual de la ITE es la vía subcutánea, aunque en los últimos años se ha demostrado la utilidad de otras vías, como la vía sublingual.

La eficacia de la ITE sublingual se ha comprobado en algunos metanálisis de ensayos randomizados en adultos con alergia respiratoria ¹¹²⁻¹¹⁵, y a pesar de que la ITE subcutánea sigue siendo la más efectiva, la Organización Mundial de la Salud (OMS) autoriza a la ITE sublingual como una alternativa válida a la vía subcutánea. Su uso está justificado en adultos ¹¹⁶⁻¹¹⁷; sin embargo, su eficacia en niños es menos evidente, debido a que los estudios realizados en esta población han mostrado resultados controvertidos ¹¹⁸.

Los mecanismos inmunológicos que intervienen en la ITE sublingual son parecidos a los que operan en la subcutánea, aunque la magnitud del cambio en muchos parámetros es más moderada.

I.6.2.3. INDICACIONES Y CONTRAINDICACIONES

La inmunoterapia debe indicarse como complemento a las medidas de evitación del alérgeno y al tratamiento farmacológico.

Indicaciones

- Enfermedades en las que se demuestre, mediante pruebas *in vivo* y/o *in vitro*, que su patogenia es consecuencia de un mecanismo inmunológico mediado por IgE.
- Cuadros clínicos: rinitis que no se controla con el tratamiento farmacológico habitual, asma alérgica y alergia a veneno de himenópteros. Muchos autores defienden que toda rinitis alérgica debe recibir inmunoterapia porque se ha demostrado que previene la aparición del asma y de nuevas sensibilizaciones.
- Sólo en el caso de alérgenos para los que se disponga de vacunas estandarizadas de conocida eficacia y seguridad.

Contraindicaciones

- Enfermedades de origen neoplásico o inmunológico, enfermedades cardiovasculares graves.
- Patologías que contraindiquen el uso de adrenalina, ya que este fármaco resulta indispensable en el tratamiento de posibles reacciones adversas anafilácticas durante el tratamiento, por ejemplo la cardiopatía isquémica, el hipertiroidismo o la hipertensión arterial.
- Tratamientos concomitantes con betabloqueantes porque en caso de anafilaxia, dificultarían la recuperación.
- No deben utilizarse en el asma severa o mal controlada. El mayor número de muertes por vacunas antialérgicas se ha dado en este grupo.
- Otras causas que originen mal cumplimiento como trastornos psiquiátricos, problemas laborales o escolares, etc.
- El embarazo puede ser considerado una contraindicación relativa. No hay riesgo documentado de teratogenia, pero si ocurriera una reacción adversa

podría resultar peligroso para el feto. Por este motivo, en las mujeres embarazadas no se inicia la inmunoterapia, pero si están en fase de mantenimiento se continúa su administración.

I.6.2.4. EFICACIA CLÍNICA

La eficacia de la ITE subcutánea se ha valorado en diferentes estudios utilizando parámetros de intensidad de síntomas, de uso de la medicación y comparando la respuesta en las pruebas de exposición controlada nasal, bronquial u ocular antes y después del tratamiento.

La eficacia de la ITE subcutánea en el tratamiento de la rinitis polínica se ha puesto de manifiesto en estudios a doble ciego y controlados con placebo con polen de gramíneas¹¹⁹⁻¹²¹, de ambrosía¹²²⁻¹²⁴, de parietaria^{125,126}, de abedul¹²⁷, o de olivo¹²⁸. Aunque no existe ningún metanálisis publicado que englobe a todos estos estudios, sí existe algún estudio recopilatorio, como el que realizaron Ross y cols.¹²⁹, quienes valoraron 16 estudios publicados entre 1966 y 1996. En 15 de ellos, la ITE demostró ser eficaz en la mejoría de síntomas y en el consumo de medicación de pacientes con rinitis alérgica.

En cuanto al asma, se dispone de cuatro metanálisis sobre la eficacia de la inmunoterapia en el asma bronquial¹³⁰⁻¹³³. En uno de ellos, el publicado por Abramson en el año 2003, se incluyeron 75 estudios que abarcaron a 3.188 pacientes con asma. De los 75 estudios, 20 correspondían a ensayos con inmunoterapia con pólenes. La principal conclusión de los revisores fue que la inmunoterapia reducía los síntomas del asma y el uso de medicación y mejoraba la HPB.

La eficacia de la ITE a largo plazo también ha sido demostrada. Durham y cols.¹³⁴ en un estudio a doble ciego y controlado con placebo, demostraron que la administración durante 3-4 años de inmunoterapia con pólenes de gramíneas producía una mejoría importante en la sintomatología estacional que se mantenía al menos 3 años después de la suspensión del tratamiento. En otro estudio más reciente de Eng y cols.¹³⁵ realizado en niños, también empleando ITE con pólenes de gramíneas, el beneficio clínico fue significativo seis años después de suspendida la vacunación.

Además, se ha demostrado que en los pacientes que reciben ITE se reduce de manera significativa el riesgo de desarrollar sensibilizaciones a otros alérgenos ^{136,137}. Es decir, la ITE serviría, además de como tratamiento etiológico, como tratamiento preventivo evitando la aparición de nuevas sensibilizaciones.

Otros estudios han evaluado la capacidad de la ITE en la prevención del desarrollo de asma en pacientes con rinitis. Se sabe que entre un 25% y un 50% de los pacientes con rinitis alérgica desarrollarán asma en algún momento de su evolución y en pacientes con rinitis polínica el riesgo de presentar asma es hasta 4 veces superior. Son varios los estudios que han demostrado que la ITE reduce el riesgo de desarrollar asma ^{138,139}.

Por último, hay que considerar que la eficacia de la inmunoterapia depende de la dosis administrada. Así, dosis bajas no son eficaces y las dosis elevadas pueden ser causa de reacciones adversas sistémicas graves. La dosis óptima se define como la dosis que induce un efecto clínico relevante sin producir efectos adversos inaceptables. Esta dosis óptima debe ser el objetivo como dosis de mantenimiento para todos los pacientes. Las dosis entre 5 y 20 µg del alérgeno principal o mayoritario se consideran óptimas para la mayoría de los alérgenos ¹⁴⁰.

I.6.2.5. SEGURIDAD

El principal inconveniente de la ITE es la posibilidad de que se produzcan reacciones alérgicas sistémicas; las más graves incluyen el asma grave y la anafilaxia. La frecuencia y gravedad de las reacciones sistémicas varía considerablemente entre los estudios publicados, debido en parte a diferencias en la metodología utilizada. En el caso de la ITE sublingual, el perfil de seguridad de la ITE es mejor; las reacciones adversas son escasas y generalmente locales ¹¹²⁻¹¹⁵.

La incidencia de reacciones sistémicas depende de varios factores: la presencia de asma, que se considera un factor de riesgo de enfermedades sistémicas; el extracto de polen utilizado (los extractos de pólenes producen en general más reacciones que la de los ácaros) y la pauta de administración.

I.7. UTILIZACIÓN DE EXTRACTOS ALERGÉNICOS EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE PACIENTES ALÉRGICOS.

Los extractos alérgicos utilizados para el diagnóstico y tratamiento de los pacientes alérgicos son mezclas de proteínas que se obtienen incubando la materia prima natural (por ejemplo pólenes, cultivo de ácaros etc.) en tampones acuosos, intentando reproducir las condiciones en que dicha materia prima interacciona con las mucosas del organismo. Mediante filtración y diálisis se purifica esta mezcla y se analiza para comprobar la presencia de todos aquellos alérgenos que se consideran relevantes.

La utilización de estos extractos alérgicos en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes alérgicos presenta algunos inconvenientes ¹⁴¹. En primer lugar, se caracterizan por una falta de estandarización, ya que a veces provienen de materiales procedentes de diversos orígenes y han sido recogidos en condiciones diferentes. Esto condiciona que exista una notable variabilidad en el contenido de los diferentes alérgenos, el cual puede cambiar considerablemente de unas preparaciones a otras.

Además los extractos naturales son mezclas heterogéneas que contienen concentraciones muy diversas de alérgenos. Algunos de ellos pueden constituir un elevado porcentaje de la proteína total del extracto, sin embargo, otros se encuentran en una porción mínima. Esto puede llevar a diagnósticos erróneos en aquellos pacientes sensibles sólo a alérgenos minoritarios, así como a inmunizaciones defectuosas, sólo eficaces frente a aquellos alérgenos más representados en los extractos.

Otro aspecto a tener en cuenta es que los extractos naturales presentan una cantidad significativa de productos no deseables, como lípidos, que pueden enmascarar ciertos alérgenos del extracto, en su capacidad de unir IgE, o como agentes oxidantes y proteolíticos que pueden provocar la pérdida o inutilización de los alérgenos proteicos, lo que haría ineficaz su empleo.

Estos problemas han obligado a diseñar nuevas estrategias que permitan obtener productos mejorados para su utilización en el diagnóstico y en el tratamiento con ITE. Se han desarrollado dos alternativas en los últimos años: la extracción de alérgenos

puros mediante técnicas convencionales, o la producción de alérgenos recombinantes mediante ingeniería genética.

I.7.1. OBTENCIÓN DE ALÉRGENOS NATURALES MEDIANTE TÉCNICAS CONVENCIONALES

La separación de proteínas alergénicas para la obtención de alérgenos puros se lleva a cabo mediante técnicas convencionales: cromatografías de penetrabilidad, intercambio iónico, afinidad, e hidrofobicidad, empleando bien la alta presión (HPLC) o a presión moderada. Estas técnicas hacen uso de diferencias en el peso molecular, la carga iónica, la actividad funcional o la solubilidad en disolventes orgánicos de las diferentes proteínas.

Con estos alérgenos puros se pueden preparar mezclas únicas, que contengan una cantidad definida de ciertos alérgenos y cuya utilización sea de carácter general, independientemente de la sensibilidad particular de cada paciente, o bien mezclas de alérgenos diseñadas a la medida de cada paciente, atendiendo a la hipersensibilidad característica de cada uno de ellos.

La utilización de estos alérgenos purificados también presenta inconvenientes: se dispone de cantidades limitadas del material de partida -pólenes, excrementos de ácaros, venenos de insectos, etc; el proceso de purificación tiene un rendimiento bajo ya que frecuentemente los alérgenos constituyen un componente minoritario del material biológico, y su reducida cantidad dificulta la aplicación eficaz de los sistemas de separación proteica. Siempre se obtiene la forma natural del alérgeno, nunca formas modificadas, que pudieran permitir usar formas hipoalergénicas en la ITE.

I.7.2. OBTENCIÓN DE ALÉRGENOS RECOMBINANTES

La producción de alérgenos proteicos puros mediante técnicas de biología molecular presenta varias ventajas frente a la utilización de alérgenos naturales. Por un lado, permite disponer de cantidades ilimitadas de producto, en ausencia de materiales indeseables que puedan perjudicar la estabilidad del alérgeno o la eficacia del procedimiento clínico en el que se aplica la molécula. Además, la utilización de

alérgenos purificados y recombinantes permite diagnosticar el perfil individual de sensibilización, es decir, a qué componentes del alérgeno está sensibilizado cada paciente, lo que ayuda a la elección de una inmunoterapia específica mucho más selectiva.

Por otro lado, la alta purificación de los alérgenos recombinantes, permite una estandarización que con los alérgenos naturales no se tenía; permite disponer de productos muy bien definidos, de estructura y propiedades conocidas, y fácilmente cuantificables y además en grandes cantidades.

I.7.2.1. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ALÉRGENOS RECOMBINANTES.

La técnica más utilizada para obtener alérgenos proteicos puros consiste en su producción recombinante en un organismo huésped, gracias a la capacidad de éste para incorporar genes ajenos en su propio genoma, y utilizar su propia maquinaria celular para traducir ese gen a proteína funcional.

Independientemente de la naturaleza del alérgeno que se quiera obtener, y del huésped que se vaya a emplear, la estrategia a seguir en el proceso de obtención de un alérgeno recombinante es siempre el mismo ¹⁴²:

- a) Inserción del gen que codifica el alérgeno en el vehículo de transferencia
- b) Incorporación de este vehículo al genoma del huésped
- c) Crecimiento o cultivo del organismo huésped, con la consecuente producción de la proteína recombinante
- d) Purificación y validación del alérgeno recombinante producido.

Para la purificación de la proteína se emplean técnicas generales (precipitaciones, cromatografías, electroforesis). La validación consiste en la comparación de las propiedades de la proteína recombinante con las de la proteína natural. Se comparan propiedades moleculares, inmunológicas y funcionales.

II. EL GRANO DE POLEN

II.1. INTRODUCCIÓN

El grano de polen constituye la espora masculina de las plantas con flores. Es el vehículo de los gametos masculinos o de sus células progenitoras.

Su función biológica es alcanzar la parte femenina de una flor de su misma especie y fecundar a la ovocélula. En algunas especies (plantas autóгамas) el polen puede realizar su función en la misma flor o en la misma planta que lo ha formado, pero en la gran mayoría de las especies (plantas alógamas) el polen sólo resulta viable si alcanza una ovocélula de otra planta de su misma especie. El traslado del polen desde el órgano donde se ha formado hasta la parte femenina de la flor se conoce con el nombre de polinización y puede efectuarse de maneras diversas, que son características para cada especie. En nuestras latitudes, los casos más frecuentes de polinización son por anemofilia, con el viento como medio de arrastre y diseminación de los granos de polen, y por entomofilia, cuando la polinización corre a cargo de insectos (abejas, mariposas, escarabajos, etc).

II.2. EL GRANO DE POLEN COMO TRANSPORTADOR DE ALÉRGENOS

Además de transportar los gametos masculinos, los granos de polen vehiculizan los alérgenos responsables de inducir polinosis. Estos alérgenos polínicos son proteínas, glicoproteínas o lipoproteínas de bajo peso molecular, que se encuentran normalmente en zonas intracelulares, aunque también se han localizado alérgenos en zonas extracelulares, como la cubierta externa que rodea al grano de polen (exina).

Los granos de polen, tras ser secretados, sufren una deshidratación rápida que reduce su volumen en un 35%. Cuando llegan a un estigma receptor o a un medio húmedo, como puede ser la mucosa de los humanos, experimentan una hidratación considerable. Esta hidratación provoca la liberación de las proteínas que transportan, que son las que intervendrán en el proceso germinativo o en la respuesta alérgica de las personas sensibles ¹⁴³⁻¹⁴⁴.

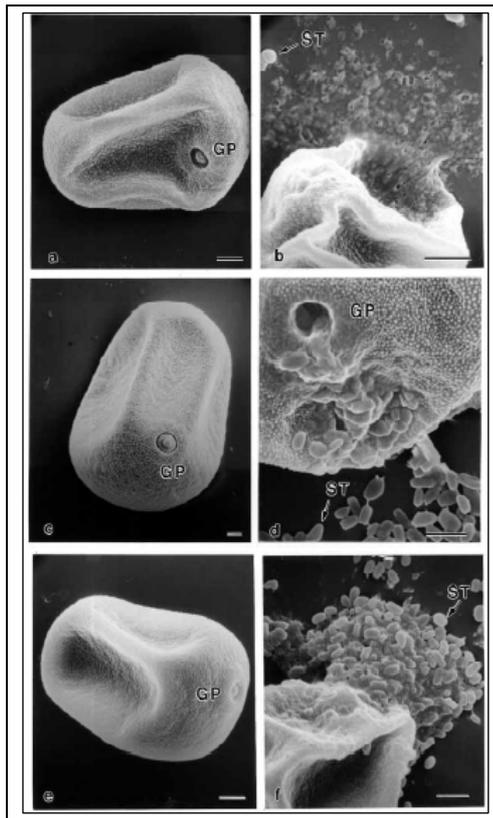


FIGURA VII. Fotografías al microscopio electrónico de pólenes de la familia Poaceae deshidratados (a, c, e) e hidratados (b, d, f). GP: poro germinal; ST: gránulo de almidón. (Tomada de Grote et al. J¹⁴⁵)

Sin embargo, el grano de polen intacto no es el único vehículo de alérgenos; existen otras partículas de pequeño tamaño ($< 10 \mu\text{m}$) que pueden transportar alérgenos polínicos de forma eficaz. Estas partículas proceden de restos de las plantas (anteras) o del interior de los granos de polen cuando éstos se rompen por la acción de la lluvia, o bien porque sus antígenos son eluidos a través de los poros y microporos de la exina y se vehiculizan absorbidos en micropartículas, como las que proceden de la combustión de los motores diesel¹¹⁻¹³.

La existencia de partículas pequeñas con capacidad alérgica podría explicar por qué los pólenes pueden producir asma bronquial, ya que la relación entre las concentraciones de pólenes y la presencia de síntomas de asma es evidente, a pesar de que el tamaño de los granos de polen es aparentemente muy grande como para poder alcanzar con facilidad las vías respiratorias intrapulmonares^{146,147}.

Se ha especulado con la posibilidad de que estas partículas pudieran encontrarse en el ambiente fuera de la época de polinización, lo que también explicaría la discordancia temporal que a veces existe entre síntomas y recuentos polínicos.

II.3. REACTIVIDAD CRUZADA

Se entiende por reactividad cruzada a la reactividad provocada contra una proteína a través de moléculas de IgE ya sintetizadas por una exposición previa a un alérgeno distinto. Este fenómeno se basa en la similitud en la estructura molecular de alérgenos procedentes de especies homólogas. Un grado de identidad en la secuencia de aminoácidos no superior al 25% puede ser suficiente para que dos proteínas se plieguen de modo equivalente y compartan una estructura terciaria común.

La reactividad cruzada entre distintos alérgenos puede demostrarse mediante pruebas *in vivo* e *in vitro*. Clínicamente, la reactividad cruzada, se traduce en reacciones causadas por antígenos homólogos de distintas especies. La reactividad cruzada es especialmente significativa en los pólenes debido al gran número de familias asociadas bajo un mismo orden, que dan lugar a la producción de moléculas con alto grado de identidad.

También es posible la sensibilización subclínica, dándose el caso de pacientes sensibilizados a distintos alérgenos que no presentan síntomas al entrar en contacto con ellos.

II.4. CLASIFICACIÓN DE LOS ALÉRGENOS DEL POLEN

Los alérgenos del polen se pueden clasificar en función de su distribución taxonómica y en función de la frecuencia de reconocimiento por parte de los pacientes alérgicos.

II.4.1. SEGÚN LA DISTRIBUCIÓN TAXONÓMICA.

Según la distribución taxonómica, los alérgenos del polen se pueden dividir en tres grandes grupos ¹⁴⁸:

- a) Alérgenos ubicuos. Están presentes en casi todas las plantas examinadas. Son

moléculas con una funcionalidad esencial cuya estructura, bien parcial o totalmente, se ha mantenido prácticamente inalterada en el proceso evolutivo. Esto hace que se mantengan epítomos comunes en distintas especies y que exista un reconocimiento inmunológico por parte de moléculas IgE dirigidas inicialmente frente a una molécula distinta. Reciben también el nombre de panalérgenos. Se conocen dos panalergenos principales: las proteínas ligantes de calcio o polcalcinas y las profilinas.

- b) Alérgenos que aparecen en un grupo limitado de plantas. Ejemplos de este tipo de alérgenos son las proteínas de transferencia de lípidos (LTP), que tiene una importante reactividad cruzada con las LTP de las frutas rosáceas.
- c) Alérgenos altamente selectivos. Son proteínas que identifican inequívocamente a una planta determinada. Es el caso de las expansinas. Se encuentran en el polen de las gramíneas y se incluyen dentro del grupo 1 de alérgenos. Las ribonucleasas también son alérgenos selectivos de determinadas plantas. Los alérgenos del grupo 5 de las gramíneas son ribonucleasas.

II.4.2. CLASIFICACIÓN SEGÚN FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO.

Según la frecuencia de reconocimiento por parte de los pacientes alérgicos, los alérgenos se clasifican en:

- a) Alérgenos mayores. Se denominan alérgenos mayores aquellos frente a los cuales presentan IgE específica más del 50% de los pacientes alérgicos. En general son los más abundantes o los que tienen mayor capacidad sensibilizante.
- b) Alérgenos menores. Los alérgenos menores son reconocidos por menos del 50% de los enfermos alérgicos.

En general los alérgenos mayores suelen ser específicos de cada planta, mientras que los alérgenos minoritarios incluyen diversos panalergenos.

II.5. POLINIZACIÓN Y CLIMA

El clima influye en la cantidad de pólenes emitidos a la atmósfera. La pluviosidad durante el otoño e invierno condiciona la mayor o menor germinación y crecimiento de las plantas, y por tanto la cantidad de pólenes que se liberan. En Madrid, se ha visto que existe una relación entre la pluviosidad pre-estacional (octubre-marzo) y los recuentos de gramíneas durante abril-julio; la asociación es tan fuerte que se ha podido desarrollar un modelo predictivo a partir de la pluviosidad de octubre-marzo que permite conocer las gramíneas atmosféricas que habrá en mayo-junio ¹⁴⁹. Esta pluviosidad pre-estacional también se ha podido comprobar que es determinante en otras ciudades de España; así, por ejemplo, en 1995-96, no sólo se pudo predecir en Madrid, sino también en Badajoz, Toledo y Ciudad Real, que comparten con Madrid el mismo clima mediterráneo continental extremo seco ¹⁵⁰.

II.6. NOMENCLATURA DE LOS ALÉRGENOS.

Para designar a los alérgenos del polen se siguen las recomendaciones publicadas por la OMS en 1994 ^{151,152}. Se nombran con las tres primeras letras del género y la primera letra de la especie. Van seguidos de un número arábigo que indica el grupo de alérgenos al que pertenecen. Por ejemplo, los alérgenos del grupo 1 de *Lolium perenne* se nombran como Lol p 1, y los alérgenos del grupo 5 de *Phleum pratense* se conocen como Phl p 5.

III. PÓLENES DE INTERÉS EN ALERGOLOGÍA.

No todos los pólenes son alergénicos. Los alérgenos de los pólenes que desencadenan rinoconjuntivitis y asma corresponden a los procedentes de los árboles y plantas que polinizan a través del aire (polinización anemófila), y no a través de los insectos (polinización entomófila). Las especies vegetales anemófilas son las gramíneas, los árboles y las malezas.

De todas las especies que las componen, se ha comprobado que sólo el polen de 178 especies de plantas puede producir reacciones alérgicas. Estas plantas pertenecen a 44 familias y 29 órdenes. Sólo 6 de estas familias contienen más de la mitad de las especies.

En España, los pólenes más importantes productores de polinosis son los procedentes de las Cupresáceas o arizónicas en enero-marzo, el abedul en abril, *Platanus hispanica* (marzo-abril), las gramíneas y olivo en abril-junio, la Parietaria de abril a julio y el *Chenopodium album* de julio a septiembre.

En un estudio coordinado por el Comité de Aerobiología de la SEAIC en el año 1995, en el que participaron 12 grupos de trabajo, las gramíneas fueron consideradas como causa número uno de polinosis en 9 de las 12 ciudades y número 2 en las 3 restantes (tras *Olea europaea* en Sevilla y Málaga, y tras *Chenopodium album* en Elche). El olivo fue considerado la segunda causa más frecuente de polinosis ¹⁵³.

III.1. POACEAE (GRAMÍNEAS)

Las gramíneas son globalmente la causa más importante de polinosis en Europa, debido a la gran alergenicidad de sus pólenes (alrededor del 50% del polen ambiental es de gramíneas) y a su extensa distribución vegetal (20% de la superficie vegetal del mundo) ⁷⁻¹⁰.

Se cultivan para mantener la vegetación en todo tipo de terrenos rurales, en jardines, con fines ornamentales, y para prevenir la erosión. Muchas de ellas son la base de la alimentación animal, ya que abundan en los prados, y del hombre, puesto que a

esta familia pertenecen los trigos (*Triticum* sp.), la cebada (*Hordeum vulgare* L.), el arroz (*Oryza sativa* L.), el maíz (*Zea mays* L.), el centeno (*Secale cereale* L.), las avenas (*Avena* sp.) y el resto de los cereales y *Saccharum officinarum* L., de donde se obtiene el azúcar de caña.



FIGURA VIII. Gramíneas.

Aunque incluye varios miles de especies, su importancia alergológica se centra en un reducido número capaces de producir polen abundante y aerovagante (granos de 20-45 μm de diámetro) ^{154,155}. Su subfamilia *Pooideae* contiene la mayoría de los géneros importantes en producir polinosis: *Phleum* (fleo), *Dactylis* (dáctilo), *Lolium* (ballico), *Trisetum* (trisetto), *Festuca* (cañuelas), *Poa* (poa), *Anthoxanthum* (grama de olor), *Holcus* (holco), *Agrostis* (agróstide) y *Alopecurus* L. (alopeкуро).

Familia	Subfamilia	Tribu	Género	Especie	Nombre común
Gramineae	Pooideae (Festucoideae)	Poeae (Festuceae)	<i>Lolium</i>	<i>perenne</i>	Centeno silvestre
			<i>Dactylis</i>	<i>glomerata</i>	Caracolillo
			<i>Festuca</i>	<i>pratensis</i>	Cañuela
		Agrostidae	<i>Poa</i>	<i>pratensis</i>	Espiguilla
			<i>Phleum</i>	<i>pratense</i>	Hierba timotea
		Aveneae	<i>Alopecurus</i>	<i>pratense</i>	Cola de zorro
			<i>Agrostis</i>	<i>alba</i>	Rastrero
			<i>Avena</i>	<i>sativa</i>	Avena
			<i>Holcus</i>	<i>lanatus</i>	Heno-lanota
			<i>Antioxanthum</i>	<i>odolatum</i>	Gramade color
			<i>Phalaris</i>	<i>acuatica</i>	Hierba canaria
			<i>Arrenatherum</i>	<i>elatius</i>	Avenilla
		Triticeae	<i>Trisetum</i>	<i>flavescens</i>	Falsa avena
			<i>Triticum</i>	<i>sativum</i>	Trigo
			<i>Secale</i>	<i>cercale</i>	Centeno
		Arundinae	<i>Hordeum</i>	<i>vulgare</i>	cebada
		Phalarideae	<i>Agropyrom</i>	<i>crisatm</i>	Grama de boticas
		Bromeae	<i>Phragmites</i>	<i>communis</i>	carrizo
<i>Anthoxantum</i>	<i>odoratum</i>		Grama de olor		
Chloridoideae	Chlorideae	<i>Bromus</i>	<i>inermis</i>	Espiguillas	
		Andropogoneae	<i>Cynodon</i>	<i>dactylon</i>	Grama común
Panicoideae	Maydeae	<i>Sorghum</i>	<i>helepnse</i>	Sorgo	
		<i>Zea</i>	<i>mays</i>	maíz	

TABLA VII. Familia Pooideae

La reactividad cruzada entre ellas es tan importante que en general es suficiente con obtener resultados para una o dos para diagnosticar y tratar a los pacientes.

III.1.1. POLINIZACIÓN DE GRAMÍNEAS

El “periodo de polinización” de las gramíneas es muy amplio debido a la diversidad de sus especies (cada una con su particular periodo de floración) y a las condiciones climáticas, oscilando entre 2-10 meses. No obstante, es probable que el “periodo de polinosis” sea mucho más corto (5-6 semanas), pues éste sólo abarcaría los días en que los recuentos superaran las cifras umbral de reactivación.

III.1.2. ALÉRGENOS DE GRAMÍNEAS

Las proteínas alergénicas de las gramíneas se distribuyen en 12 grupos de

alérgenos según las similitudes fisicoquímicas que presentan, de tal manera que los componentes de un mismo grupo tienen en común secuencias moleculares, independientemente de la especie de procedencia.

Entre el 80% y el 90% de los pacientes alérgicos a gramíneas presentan IgE específica a los alérgenos del grupo 1 y grupo 5, que son alérgenos mayoritarios.

Gramínea	Nombre de alérgeno	Función biológica	Prevalencia IgE (%)
<i>Cynodon dactylon</i>	Cyn d 1	Unión calcio	87
	Cyn d 7		10
	Cyn d 12	Profilina	20
<i>Dactylis glomerata</i>	Dag g 1		75
	Dag g 2		45
	Dag g 3		60
	Dag g 5		-
<i>Lolium perenne</i>	Lol p 1	Citocromo C Inhibidor tripsina	87
	Lol p 2		63
	Lol p 3		63
	Lol p 5		85
	Lol p 10		-
	Lol p 11		65
<i>Phleum pratense</i>	Phl p 1	Ribonucleasa Partícula P asociada Unión de calcio Profilina Poligalacturonasa	96
	Phl p 2		60
	Phl p 4		56
	Phl p 5		80
	Phl p 6		75
	Phl p 7		10
	Phl p 12		20
	Phl p 13		50
<i>Poa pratensis</i>	Poa p 1	Citocromo C	-
	Poa p 5		90
	Poa p 10		-

TABLA VIII. Alérgenos descritos en gramíneas. Los datos de prevalencia no están claramente establecidos, siendo a veces contradictorios.

Se conoce la función de la mayoría de los alérgenos de gramíneas¹⁵⁷. El grupo 1, uno de los más relevantes, posee una alta identidad de secuencia con las expansinas (60-70%). El grupo 2/3 comprende proteínas no glicosiladas de peso molecular entre 10 y 12 Kda. Los alérgenos del grupo 4 constituyen los de mayor tamaño aislados hasta la fecha, con masas moleculares comprendidas entre 55 y 67 Kda. El grupo 5 de alérgenos

es exclusivo de Pooideae, no habiéndose detectados miembros de este grupo en otras subfamilias. Presentan actividad RNAsa y se sugiere su implicación en mecanismos de defensa. Los alérgenos del grupo 6 son citocromos y están restringidos a las especies del género *Poa*. Los grupos 7 y 12 están formados por panalérgenos que presentan elevada reactividad cruzada con alérgenos de otras especies vegetales¹⁵⁶. Los grupos 8, 9, 10 y 11 tienen menor relevancia.

III.2. OLEACEAE

La familia de las Oleáceas engloba a unas 600 especies agrupadas en 30 géneros, pero sólo tres contribuyen en la carga atmosférica de pólenes: los "aligustres" (*Ligustrum lucidum* y *L. vulgare*, un arbusto a menudo utilizado para la formación de setos), los "fresnos" (*Fraxinus excelsior*, *F. angustifolia*, *F. ornus*) y el olivo (*Olea Europaea*), siendo con mucho el más abundante y alergénico éste último.



Figura IX. Oleaceae. De izquierda a derecha: *Ligustrum Lucidum*, *Fraxinus angustifolia*, *Olea Europaea*.

El olivo se cultiva fundamentalmente en el área Mediterránea (España, Portugal, Italia, Israel, Grecia y Turquía), y algunas zonas de Norte-América (California, Arizona).

III.2.1. POLINIZACIÓN DEL OLIVO

En España, la polinización de olivo se prolonga durante los meses de abril a julio, con niveles máximos entre la segunda quincena de mayo y la primera de junio, debido al incremento de las temperaturas al final de la primavera.

Al igual que sucede con otras plantas, la presencia atmosférica del polen de olivo muestra una gran variabilidad interanual; se alternan años con emisiones elevadas de polen con otros en los que se observa una escasa concentración polínica¹⁵⁸. A este fenómeno se le conoce como “fenómeno de alternancia de cultivos”, y es debido a la competencia por las sustancias nutritivas de la planta entre las frutas de una temporada y las flores de la temporada siguiente, que lleva a una alternancia en la producción: un rendimiento alto de flores y frutas se alterna con otro bajo en pólenes y producción.

III.2.2. ALÉRGENOS DE OLIVO

Se han purificado y caracterizado 10 alérgenos del extracto de polen de *O. europaea*. La presencia de IgE frente a estos alérgenos depende de la población estudiada. Ole e 1 es el alérgeno más abundante en el polen (hasta el 20% del total del contenido proteico) y el más prevalente, en algunas zonas está presente en más del 70% de los pacientes sensibilizados a polen de olivo. En zonas con bajos recuentos de pólenes, se comporta como el único alérgeno mayor, mientras que en zonas con recuentos polínicos elevados los alérgenos Ole e 6, Ole e 7 y Ole e 9 también pueden afectar a más del 50% de la población.

Excepto para Ole e 1, Ole e 4 y Ole e 6, se conoce la función de los alérgenos del olivo: profilina (Ole e 2), superóxido dimutasa (Ole e 5), polcalcinas (Ole e 3 y Ole e 8), LTPs (Ole e 7), proteínas que unen β -glucanos (CBM43) y 1,3- β -glucanasa (Ole e 9)¹⁵⁹. Éste último podría estar implicado en la reactividad cruzada con otros alérgenos vegetales (por ejemplo, látex, plátano). Ole e 7, a pesar de pertenecer a la familia de las LTPs, no muestra una reactividad cruzada significativa porque su secuencia polipeptídica muestra una limitada similitud con las de otras LTPs.

	Prevalencia IgE	Familia
Ole e 1	55-90%	Desconocida
Ole e 2	24%	Profilina
Ole e 3	20-30%	Polcalcina
Ole e 4	80%	Desconocida
Ole e 5	35%	Superóxido dismutasa Cu/Zn
Ole e 6	10-55%	Desconocida
Ole e 7	47%	LTP
Ole e 8	5%	Proteína ligante de Ca ²⁺
Ole e 9	65%	1,3-β-glucanasa
Ole e 10	55-69%	CBM43

TABLA IX. Alérgenos del olivo

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

I. JUSTIFICACIÓN

Dada la elevada prevalencia de las reacciones alérgicas a pólenes, resultaría importante esclarecer los mecanismos implicados en la sensibilización alérgica, así como los cambios inmunológicos que se producen en los pacientes alérgicos tras el tratamiento con ITE, única terapia capaz de modificar el curso natural de la enfermedad, mejorando o incluso provocando la remisión completa de los síntomas alérgicos. Aunque la eficacia clínica de la ITE está bien establecida, los cambios inmunológicos que se producen siguen sin estar completamente definidos.

En este estudio, se pretende analizar la expresión de parámetros inmunológicos poco utilizados para valorar la evolución de pacientes alérgicos a pólenes tratados con ITE, como las moléculas coestimuladoras CTLA-4 y CD40L, el factor de transcripción Foxp3, como marcador de las células nTreg, y el test de activación de basófilos. Alguno de estos marcadores podría ser útil para valorar la eficacia de la ITE.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

- Encontrar parámetros de seguimiento que sean de utilidad clínica para predecir la eficacia de la ITE. Para ello se evaluará los cambios clínicos e y los cambios inmunológicos que se producen en pacientes alérgicos a pólenes de olivo y/o gramíneas tratados y no tratados con ITE.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Evaluar el balance entre linfocitos Th2 y células Treg en pacientes con alergia a pólenes de gramíneas y olivo con respecto a individuos no atópicos tras estimulación in vitro con alérgenos específicos.
- Relacionar la eficacia de la ITE con los mecanismos inmunológicos implicados en la sensibilización/tolerancia a alérgenos.
- Establecer el mapa de sensibilización a alérgenos mayores y menores de gramíneas y olivo en Ciudad Real

MATERIAL Y MÉTODOS

I. DISEÑO

Se presenta un estudio prospectivo de cohortes en el que se ha valorado la evolución de pacientes alérgicos a pólenes de gramíneas y/o olivo tratados y no tratados con ITE. Antes de iniciar el tratamiento, se analizaron las diferencias en la producción de citoquinas por linfocitos T CD4 y en el porcentaje de células Treg entre los pacientes alérgicos y controles no atópicos de edad y sexo similares a los pacientes alérgicos. Al grupo de controles no atópicos lo referiremos a partir de ahora como grupo CNA, y al conjunto de pacientes alérgicos como grupo P.

Este último grupo, grupo P, se dividió posteriormente en:

- Grupo A, grupo de pacientes alérgicos, al que se le administró ITE más tratamiento sintomático para el control de los síntomas alérgicos y
- Grupo C, grupo control que sólo recibió tratamiento sintomático.

II. SUJETOS DE ESTUDIO

Se seleccionaron de forma prospectiva, los pacientes con asma bronquial alérgica a pólenes de olivo y/o gramíneas, que acudieron al Servicio de Alergia del Hospital General de Ciudad Real y que cumplían con los siguientes criterios de inclusión/exclusión:

II.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- 1.- Edad: 12-50 años.
- 2.- Residencia superior a cinco años en Ciudad Real
- 3.- Pacientes que durante los dos últimos años refieran síntomas de asma estacional controlada según criterios de la GINA 2008.
- 4.- Test cutáneos con aeroalérgenos positivos para olivo (*Olea europaea*) y/o gramíneas (*Lolium perenne*).

II.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- 1.- Pacientes que hayan recibido tratamiento con ITE durante los dos últimos

años.

2- Pacientes con clínica de asma estacional no controlado.

3- Pacientes con clínica de asma bronquial perenne.

4- Pacientes en tratamiento con β -bloqueantes.

5- Pacientes que tengan alguna patología en la que este contraindicada la adrenalina (hipertiroidismo, hipertensión arterial, cardiopatía, etc.).

6- Enfermedad autoinmune (tiroiditis, lupus, etc.).

7- Embarazo.

8- Pacientes en los que se pueda sospechar un mal cumplimiento del estudio o del tratamiento (enfermedades psiquiátricas, alcohólicos, toxicómanos).

9- Pacientes con enfermedad orgánica grave.

II.3. MUESTREO Y TAMAÑO DE LAS MUESTRAS

Se estudiaron un total de 49 pacientes, distribuidos en tres grupos, aceptando un riesgo alfa de 0,05 para una proporción estimada de acuerdo a datos bibliográficos de 90% pacientes con respuesta a la ITE:

- 1) Grupo con inmunoterapia (grupo A): 20 pacientes alérgicos a pólenes de olivo y/o gramíneas, a los que tras su aceptación se les administró tratamiento con ITE.
- 2) Grupo sin inmunoterapia (grupo C): 11 pacientes alérgicos a pólenes de olivo y/o gramíneas, que tras recibir información, rechazaron el tratamiento con ITE.
- 3) Grupo control (grupo CNA): 18 pacientes no alérgicos similares en cuanto a edad y sexo al grupo de pacientes alérgicos.

III. TRATAMIENTO

III.1. ITE

Las vacunas administradas (Pangramin Plus ®, ALK Abelló SA) están estandarizadas biológicamente y en unidades de masa. La estandarización biológica

implica una constancia en la potencia y en la composición alérgica, y la estandarización en unidades de masa una homogeneidad en el contenido ($\mu\text{g/ml}$) del alérgeno(s) mayoritario(s).

A los pacientes monosensibilizados a gramíneas y a los polisensibilizados a gramíneas y olivo, se les administró una vacuna que contiene una mezcla del polen de seis gramíneas (*Dactylis*, *Festuca*, *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Secale*), siendo los alérgenos mayoritarios los del grupo 5. Para los pacientes monosensibilizados a olivo, se empleó un extracto del polen de *Olea europaea*, con los alérgenos mayoritarios Ole e 1 y Ole e 9 cuantificados en $\mu\text{g/ml}$.

La administración de la vacuna en el grupo A se realizó por vía subcutánea mediante una pauta convencional.

III.2. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

Para el tratamiento de los síntomas alérgicos se utilizaron antihistamínicos orales, β_2 agonistas y glucocorticoides nasales, según las pautas recomendadas.

IV. VARIABLES A ESTUDIO

Dado que el proyecto pretende relacionar el efecto clínico de la ITE con los fenómenos inmunológicos implicados en la desensibilización a alérgenos, las variables a estudio fueron tanto clínicas como inmunológicas.

IV.1. VARIABLES CLÍNICAS

Se valoraron en los dos grupos de pacientes alérgicos:

1. Test cutáneos con olivo y/o gramíneas, mediante estudio de líneas paralelas, antes de iniciar la inmunoterapia y a los 6 meses.

2. Cuadernos de recogida de datos (CRD) a los 6 meses de iniciar la vacunación en el grupo A.

3. Cuestionarios sobre calidad de vida: 'mini AQLQ' a los 6 meses de comenzar el tratamiento con ITE en el grupo activo.

IV.1.1. PRUEBAS CUTÁNEAS

La realización de las pruebas cutáneas se llevó a cabo en el Servicio de Alergia del Hospital General de Ciudad Real. Se realizaron en el antebrazo y por duplicado, entre la fosa antecubital y la muñeca, mediante la técnica de *prick test*. Se utilizaron:

- Extractos alérgicos de gramíneas y de olivo de laboratorios ALK-Abelló de distintas concentraciones.
- Control positivo (histamina) a una concentración de 10 mg/ml.
- Control negativo (solución salina).

Se prepararon tres concentraciones (1/1, 1/10 y 1/100) de cada extracto, utilizando PBS como diluyente. Para marcar la zona de aplicación de los alérgenos, se utilizó un rotulador, respetando una distancia mínima entre cada marca de 2 o 3 cm. Se colocó una gota de los extractos y de las diluciones a testar en cada una de las marcas, y se puncionó con una lanceta, verticalmente en relación a la superficie cutánea. Se utilizó una lanceta distinta para cada extracto. La lectura se efectuó a los 15-20 minutos, perfilando las pápulas con rotulador. Se consideraron positivas aquellas de un diámetro igual o mayor a 3 mm en presencia de un control negativo de 0 mm y de un diámetro mayor de 3 mm en el control positivo.

IV. 1.2. CARTILLAS DE SÍNTOMAS Y MEDICACIÓN

La sintomatología de cada paciente se valoró mediante la cumplimentación de CRD. La cumplimentación de estas cartillas por los pacientes se llevó a cabo durante los meses de Abril, Mayo y Junio de 2011, correspondientes a los períodos de mayor exposición alérgica en Ciudad Real.

Los síntomas que se valoraron fueron:

Óculo-nasales: picor ocular, irritación ocular, prurito nasal, rinorrea, estornudos, obstrucción

Pulmonares: disnea, sibilancias, tos

Los resultados obtenidos se valoraron siguiendo una escala que puntúa los síntomas de acuerdo a una escala numérica:

- 0** = Sin síntomas. No hay síntomas, incluso con actividad física normal
- 1** = Síntomas leves. Síntomas durante la actividad física, pero no en reposo.
- 2** = Síntomas moderados. Síntomas en estado de reposo; los síntomas pueden interferir con la actividad diaria.
- 3** = Síntomas intensos. Síntomas intensos en reposo (puede no haber sibilancias); los síntomas provocan dificultad para andar y hablar; retracción de los músculos del cuello y/o intercostales al respirar.

De igual forma, se utilizó una escala numérica para valorar y poder comparar la medicación utilizada para controlar los síntomas alérgicos:

- 0** = Ningún fármaco
- 1** = Antihistamínicos orales o agonistas
- 2** = corticoesteroides nasales o bronquiales
- 3** = corticoesteroides sistémicos

IV.1.3. CUESTIONARIO DE VIDA Mini-AQLQ.

El mini-AQLQ es una versión reducida del cuestionario de calidad de vida en asma (*Asthma Quality of Life Questionnaire*, AQLQ) que fue desarrollado por Juniper y cols en la Universidad de McMaster de Hamilton (Ontario), Canadá. Surgió ante la necesidad de producir una versión más corta que la original para uso en ensayos clínicos con un número amplio de pacientes, para la monitorización de grupos de pacientes y para encuestas de salud a gran escala.

El mini-AQLQ contiene 15 ítems en 4 dimensiones: limitación de actividades habituales (4 ítems), síntomas (5 ítems), función emocional (3 ítems) y estímulos ambientales (3 ítems).

Las opciones de respuesta para cada ítem se sitúan en una escala equidistante de 7 puntos, donde 1 = máxima limitación y 7 = ausencia de limitación. El cuestionario

proporciona una puntuación global, que es la media para todos los ítems, y una puntuación para cada dimensión, que es la media de los ítems correspondientes.

IV.2. VARIABLES INMUNOLÓGICAS.

Las variables inmunológicas recogidas

1. Niveles de IgE específica frente a antígenos recombinantes:
 - Olivo (Ole e1, Ole e7, Ole e9)
 - Gramíneas (Phl p1, Phl p5)
 - Panalergenos (Pho d 2, Pru p3, Che a 3)
2. Identificación de células T reguladoras (Treg): marcaje de moléculas CD4⁺ Foxp3⁺ por citometría de flujo.
3. Producción de citoquinas reguladoras: células productoras de IL10 y TGF- β determinadas como marcaje intracelular por citometría de flujo tras estimulación con el alérgeno específico.
4. Función de células Th2: linfocitos CD4 productores de IL4 determinados como marcaje intracelular por citometría de flujo tras estimulación con el alérgeno específico.
5. Función de células Th1: linfocitos CD4 productores de INF- γ determinados como marcaje intracelular por citometría de flujo tras estimulación con el alérgeno específico.
6. Expresión de las moléculas co-estimuladoras CTLA-4 (CD152) y CD40L (CD154) en pacientes alérgicos.
7. Ensayo de activación de basófilos por pólenes en el grupo P.

IV.2.1. NIVELES DE IGE ESPECÍFICA A ALÉRGENOS RECOMBINANTES

La cuantificación de IgE específica se llevó a cabo en el autoanalizador Immucap 250, mediante el sistema CAP de fluoroenzimoinmunoanálisis (FEIA) de Phadia. Este sistema consta de una fase sólida, el InmunoCAP, un polímero tridimensional de celulosa al que se une covalentemente el alérgeno de interés.

Al poner en contacto la fase sólida con el suero del paciente, la IgE específica reacciona con el alérgeno unido. Posteriormente, tras detener la reacción, es posible con un contador de fluorescencia determinar el grado de fluorescencia de la muestra y compararlo con los estándares de referencia que se han utilizado. Las pruebas ImmunoCap usan un calibrador directamente trazado por la OMS (2ª referencia Internacional de Preparación de Suero Humano de IgE 75/502).

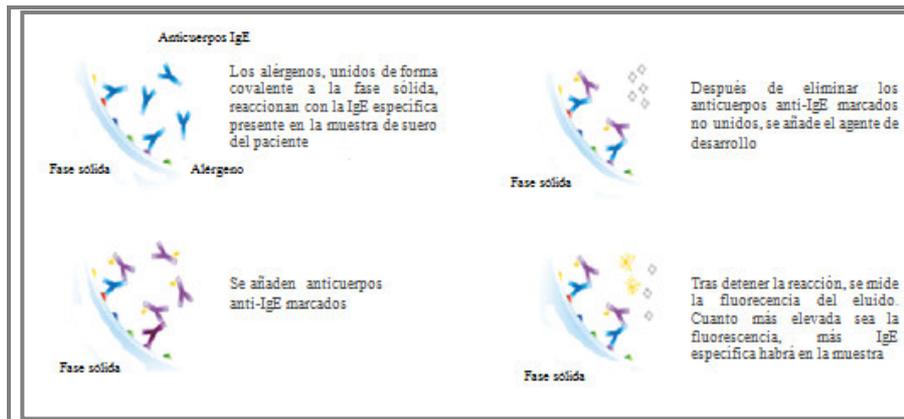


FIGURA X. Método de detección de IgE específica con ImmunoCAP

IV.2.2. ESTUDIO DE MARCADORES DE CÉLULAS TREG Y CÉLULAS TH

IV.2.2.1. CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de células alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula (el tamaño, complejidad de núcleo y citoplasma, características antigénicas) y que son recogidos por distintos detectores. Estos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula.

Las señales producidas por la interacción de las células con el haz de luz son de dos tipos:

a) Señales de dispersión. La dispersión resulta de la interacción de la luz con las células, lo que produce un cambio de dirección (no de la longitud de onda) en todas las

direcciones del espacio. Las características morfológicas que determinan la dispersión de la luz son fundamentalmente el tamaño celular, la membrana, el núcleo y el material granular del interior de la célula, llamado complejidad. En los citómetros de flujo se miden dos fracciones de dispersión:

- La luz dispersada en ángulo cónico pequeño que casi coincide con la dirección de la luz incidente, llamada FSC (Forward Scatter). Es una medida proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión.
- La luz dispersada en ángulo recto llamada SSC (Side Scatter). Es proporcional a la complejidad de la estructura interna de la partícula.

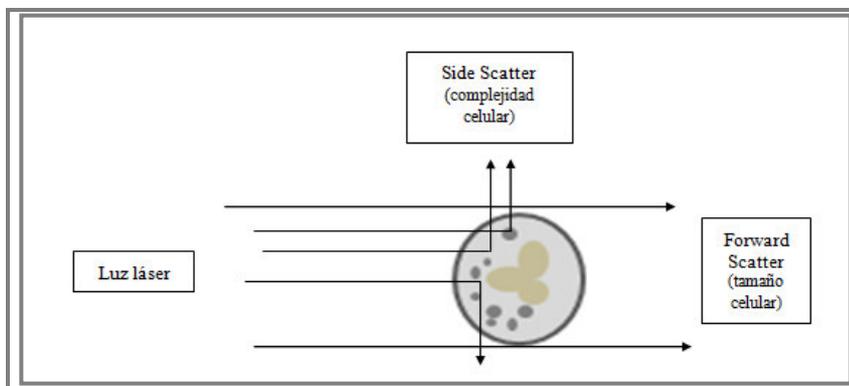


FIGURA XI. Señales de dispersión detectadas en un citómetro.

b) Señales de Fluorescencia: Los citómetros de flujo permiten detectar señales de fluorescencia procedentes de complejos antígeno/anticuerpo marcados con un fluorocromo y situados en una célula. Un fluorocromo es una molécula química que absorbe luz a una determinada longitud de onda (energía) y emite a una longitud superior (menor energía). Cuando un fluorocromo interacciona con la luz de excitación procedente del láser emite energía radiante, siendo la cantidad de señal de fluorescencia emitida igual a la proporción de la cantidad de componentes fluorescentes de la célula.

La representación gráfica de las poblaciones celulares, conocidas como citogramas, se presentan sobre un eje de coordenadas X/Y. Las poblaciones celulares, representadas por agrupaciones homogéneas de puntos, se situarán en los citogramas dependiendo de sus características físicas de dispersión (SSC/FSC) y sus características

antigénicas. Una de las aplicaciones más importantes de la citometría de flujo es que permite la cuantificación de poblaciones celulares específicas.

Existen varios tipos de citogramas, en función de las características que se representen para la identificación de las células. En este estudio, se han utilizado dos tipos de citogramas: (1) los citogramas mixtos, que utilizan una característica de dispersión (SSC/FSC) enfrentada a una característica antigénica (anticuerpo marcado con un fluorocromo) para seleccionar las células que expresan un antígeno dependiendo de una característica de dispersión, y (2) los citogramas de fluorescencia, que detectan células marcadas con dos anticuerpos monoclonales conjugados con dos fluorocromos distintos.

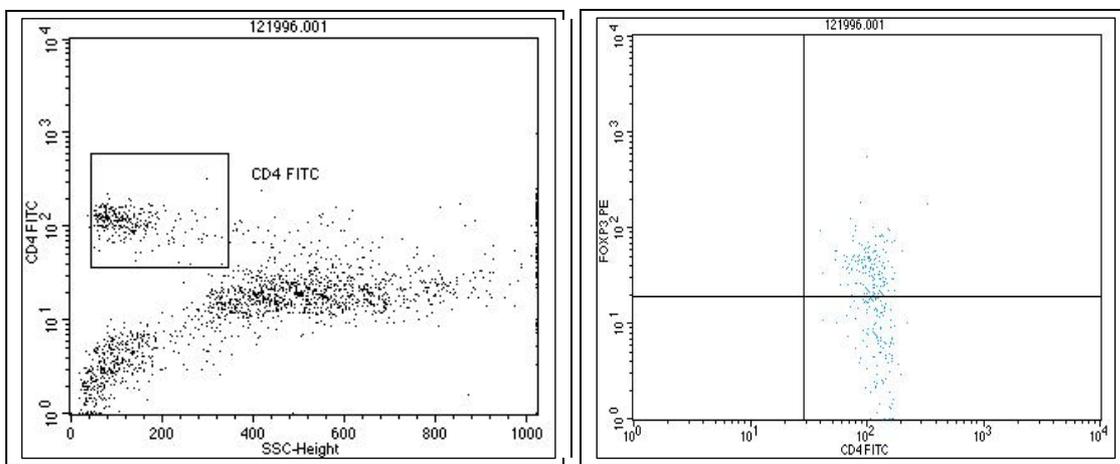


FIGURA XII. Citograma mixto (izquierda) y citograma de fluorescencia (derecha).

El estudio se ha realizado en el citómetro FACScan, citómetro de sobremesa que consta de un láser de argón de 488 nm y una serie de detectores o fotomultiplicadores que pueden medir simultáneamente Forward Scatter (dispersión frontal), Side Scatter (dispersión lateral) y 3 fluorescencias, recogidas como FL1 (verde), FL2 (naranja) y FL3 (roja). El software utilizado es el BD CellQuest Pro™.

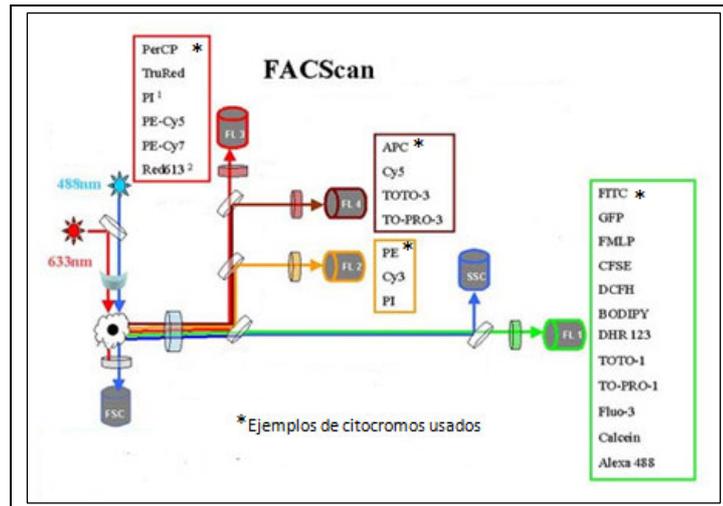


FIGURA XIII. Citómetro FACScan.

IV.2.2.2. MARCAJE CITOPLASMÁTICO Y DE MEMBRANA.

La técnica de marcaje citoplasmático y de membrana se utiliza para detectar antígenos presentes en el interior de la célula (citoplasma y núcleo) y en la superficie celular al mismo tiempo. Las células son marcadas primeramente con los anticuerpos monoclonales destinados a los antígenos de superficie. Posteriormente son fijadas y permeabilizadas para marcar los antígenos intracitoplásmicos con los anticuerpos monoclonales destinados a ello.

Los antígenos citoplasmáticos estudiados han sido: IL-10, IL-4, IFN- γ , TGF- β y Foxp3. Los antígenos de membrana: CD40L y CTLA-4. Los extractos de polen de olivo y gramíneas usados para la estimulación in vitro de linfocitos pertenecen a ALK-Abelló, conteniendo ambos una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de los alérgenos mayores Ole e 1 y Phl p 5, respectivamente.

Excepto para marcar las moléculas Foxp3, se utilizó para fijar y permeabilizar las células el kit *BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization with BD Golgi Plug™* (Becton, Dickinson and Company). Este kit contiene una solución de fijación/permeabilización, una solución de permeabilización/lavado y brefeldina A. La brefeldina A es un inhibidor del transporte de proteínas, que impide que las citoquinas producidas durante la estimulación linfocitaria salgan al exterior celular. Para la estimulación linfocitaria se utilizaron dos mitógenos: miristato-acetato de forbol (PMA)

e ionomicina (*Sigma-Aldrich*). Después de fijar y permeabilizar las células, se marcaron los antígenos con sus anticuerpos monoclonales específicos (*Becton, Dickinson and Company*)

Para detectar las células Foxp3+, se usó el kit *Human Foxp3 Buffer Set* (*Becton, Dickinson and Company*), que contiene una solución de fijación (Buffer A) y una solución de Permeabilización (Buffer C).

Los citogramas utilizados para el análisis en el citómetro de flujo han sido tanto mixtos como de fluorescencia.

PROCEDIMIENTO

El procedimiento se realiza en tres días consecutivos.

Día 1

- Añadir a dos tubos estériles de 10 ml, 1 ml de sangre de cada paciente anticoagulada con heparina. Rotular un tubo como 'Tubo A' y otro como 'Tubo B'
- Añadir a cada tubo los estímulos de polen (5 µL de Ole e 1 y 5 µL de Phl p 5) (en campana de flujo laminar)
- Mezclar en vórtex
- Dejar en estufa a 37° C y 5% de CO₂ durante 24 horas

Día 2

- Añadir 5 µL de PMA, 5 µL de Ionomicina y 5 µL de Brefeldina A al tubo A (en campana de flujo laminar)
- Mezclar en vórtex
- Dejar en estufa 16 horas

Día 3

- Agitar en Vortex

1) Marcaje de CTLA-4 y CD40L. A partir de la muestra del tubo B:

- Añadir a 50 μ L de sangre de cada paciente, 5 μ L del anticuerpo monoclonal anti-CD4 conjugado con el fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceína)
 - Separar 25 μ L de cada paciente en 2 tubos de citómetro (uno para marcar CTLA-4 y otro para CD40L)
 - En el tubo para CTLA-4 añadir 5 μ L del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 marcado con PE (ficoeritrina)
 - En el tubo para CD40L añadir 5 μ L del anticuerpo monoclonal anti-CD40L marcado con FE.
 - Incubar 20 minutos en oscuridad
 - Añadir 1,5 mL de solución comercial de lisis de hematíes (dietilenglicol y formaldehído)
 - Centrifugar a 2000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos
 - Decantar
 - Lavar con 2 ml de solución PBS
 - Volver a centrifugar
 - Decantar
 - Analizar en el citómetro.
- 2) Marcaje de $\text{INF}\gamma$, IL-4, IL-10, $\text{TGF}\beta$ y Foxp3
- Añadir 250 μ L del tubo A y 50 μ L del tubo B a dos tubos de citómetro previamente rotulados como A y B, respectivamente.

Tinción de membrana

- Añadir 25 μ L del anticuerpo monoclonal anti-CD4 conjugado con el fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceína) al tubo A y 5 μ L al tubo B
Incubar 20 minutos en oscuridad
- Añadir 1,5 mL de solución comercial de lisis de hematíes (dietilenglicol y formaldehído)
- Centrifugar a 2000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos
- Decantar

- Lavar con 2 ml de solución PBS
- Volver a centrifugar
- Decantar

Tinción intracelular (Foxp3)

- Por cada muestra, preparar en un tubo:
 - 225 μ L de Agua destilada
 - 25 μ L de Buffer A
 - 5 μ L de Buffer B
- Incubar en oscuridad durante 20 minutos
- Añadir 250 μ L al tubo B
- Centrifugar 2000 rpm durante 5 minutos
- Añadir 1,5 mL de PBS
- Incubar en oscuridad 10 minutos
- Centrifugar 2000 rpm durante 5 minutos
- Resuspender en 250 μ L de PBS y agitar en vortex
- Añadir 10 μ L del anticuerpo monoclonal anti- Foxp3 marcado con PE
- Incubar 30 minutos en oscuridad
- Añadir 1,5 mL de PBS
- Centrifugar 2000 rpm durante 5 minutos
- Añadir 500 μ L de PBS
- Analizar en el citómetro

Tinción intracelular (INF γ , IL-4, IL-10, TGF β)

- Añadir 500 μ L de la solución de Fixation/Permeabilización al tubo A
- Mezclar en vórtex
- Incubar en oscuridad durante 30 minutos
- Centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos
- Decantar y añadir 2 ml de solución BD Permeabilization/Wash
- Incubar 10 minutos en oscuridad

- Centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos
- Decantar y resuspender en 250 μ L de solución BD Permeabilization/Wash
- Agitar en vórtex
- Distribuir los 250 μ L del tubo A en 4 tubos diferentes cada uno con 50 μ L identificados como: INF γ , IL-4, IL-10, TGF β
- Añadir 10 μ L de su correspondiente monoclonal (marcados con PE)
- Incubar 30 minutos en oscuridad
- Añadir 2 ml de solución BD Permeabilization/Wash
- Centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos
- Decantar y añadir 500 μ L de PBS
- Analizar en el citómetro.

IV.2.3. ENSAYO DE ACTIVACIÓN DE BASÓFILOS

El test de activación de basófilos se ha realizado con el kit BASOTESTTM, de *Glycotope Biotechnology*, que permite la determinación cuantitativa de la degranulación de basófilos en sangre heparinizada.

En el ensayo de activación de BASOTESTTM, en primer lugar, las muestras se incuban con un tampón de estimulación suministrado con el kit que contiene IL-3 (Reactivo B) y posteriormente con un extracto alergénico que contiene una mezcla de 7 gramíneas (reactivo D). Como control positivo se utiliza el péptido N-formil-Metionina-Leucina-Phenilalanina (fMLP), péptido derivado de bacterias que activa los neutrófilos para desgranularse, y que también viene incluido en el kit (reactivo E). Como control negativo se utiliza el reactivo A del kit, que tiene una composición similar al PBS.

Estímulo	%de granulocitos basófilos activados
Reactivo A (control negativo)	1,8-9,5
Reactivo E (control positivo)	25,2-59.5

TABLA X. Intervalo normal de basófilos activados en control negativo y control positivo

La activación de basófilos provoca la fusión de gránulos citoplasmáticos con la membrana plasmática y la consecuente liberación de mediadores inflamatorios. El proceso de degranulación se detiene mediante la incubación de las muestras en hielo. A continuación las células se marcan con dos anticuerpos monoclonales, un anticuerpo anti-IgE marcado con PE y un anticuerpo anti-CD63 marcado con FITC, ambos suministrados en el kit (reactivo F). Por último, se lisan los hematíes con la solución de lisis (reactivo G) y se realizan varios lavados con la solución A.

La lectura en el citómetro de flujo se realizó mediante la utilización de citogramas de fluorescencia.

Procedimiento

- Añadir 100 μ L de sangre total heparinizada de cada paciente en un tubo de citómetro. De uno de los pacientes, añadir 200 μ L más (100 μ L y 100 μ L) en dos tubos marcados con (+) y (-) (se utilizan como control positivo y negativo, respectivamente.)
- Añadir 20 μ L de Reactivo B a cada uno de los tubos
- Mezclar en vortex
- Incubar 10 minutos en oscuridad
- Añadir:
 - o 100 μ L del extracto alergénico de gramíneas (reactivo D) a cada uno de los tubos de muestras
 - o 100 μ L de fMLP (reactivo E) al control positivo
 - o 100 μ L de reactivo A al control negativo
- Detener la degranulación colocando los tubos en un baño con hielo durante 5 minutos
- Añadir 20 μ L del reactivo F a cada uno de los tubos
- Agitar en Vortex e incubar 20 minutos en oscuridad
- Añadir 2 mL de reactivo G
- Dejar en oscuridad 10 minutos
- Centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos
- Decantar
- Lavar con 3 ml de solución A
- Volver a centrifugar y decantar

- Añadir 2 ml de solución A a cada una de las muestras.
- Leer en citómetro.

V. PLAN DE TRABAJO

ETAPA T0

Enero-Junio 2010

Se realizó:

- La inclusión de pacientes, comprobando que cumplían todos los criterios de inclusión/exclusión.
- Estudio inmunológico:
 - Análisis de células Treg y porcentaje de células Th1/Th2 en pacientes no alérgicos (grupo CNA, donantes de sangre)
 - Análisis del perfil de reactividad de los pacientes alérgicos frente a alérgenos recombinantes.
- Estudio alergológico: test cutáneos en prick-test mediante ensayo de líneas paralelas, con pólenes de gramíneas y olivo en el grupo P.

ETAPA T1

Septiembre-Diciembre 2010

- Estudio inmunológico en pacientes alérgicos: análisis previo a la terapia analizando células Treg, porcentaje de células Th1/Th2, activación de basófilos y moléculas coestimuladoras (CTLA-4 y CD40L).
- Tratamiento alergológico: comienzo de la ITE en el grupo P.

ETAPA T2

Abril-Mayo 2011 (previo a la polinización)

En los dos grupos de pacientes alérgicos (grupo P y A), se realizó:

- Estudio inmunológico: repetición del análisis tras 6 meses de tratamiento con ITE.
- Estudio alergológico: test cutáneos en *prick test* mediante ensayo de líneas paralelas tras 6 meses de ITE.

ETAPA T3

25 mayo-5 junio 2011 (pico polínico)

En los dos grupos de pacientes alérgicos (grupo A y C), se valoró:

- La cumplimentación en el CRD de los síntomas y fármacos
- Cuestionario de calidad de vida con asma 'mini-AQLQ

ETAPA T4

Octubre-Diciembre 2011

En el grupo A, se realizó:

- Estudio inmunológico: repetición del análisis tras 1 año de ITE.

VI. ANÁLISIS DE LOS DATOS

El análisis de los datos del estudio se ha realizado con el paquete estadístico SPSS versión 19.0.

Las variables cualitativas se han descrito mediante frecuencias absolutas y porcentajes, y las cuantitativas mediante la media, la desviación típica, el intervalo de confianza del 95% para la media, la mediana, el rango intercuartil y los valores máximos y mínimos de la distribución.

Para analizar las diferencias en las variables cualitativas entre los grupos se ha utilizado la prueba Ji-Cuadrado.

En el caso de las variables cuantitativas, debido al pequeño tamaño de las muestras, se han usado test no paramétricos de comparación de medias. Para comparar las variables cuantitativas entre grupos se ha utilizado la prueba no paramétrica de Mann-Whitney y para analizar el cambio en la respuesta de cada sujeto en las distintas etapas del estudio, la prueba no paramétrica de Wilcoxon, que permite el tratamiento de datos relacionados.

RESULTADOS

I. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO

El estudio incluyó inicialmente 49 pacientes, 31 pacientes alérgicos y 18 controles no alérgicos (donantes de sangre similares en edad y sexo a los pacientes alérgicos) (tabla XI).

TABLA XI. Variables demográficas de la población a estudio.

		Total	Controles no alérgicos	Pacientes alérgicos
N		49	18	31
Sexo	Femenino	24	9 (50%)	16 (51,6%)
	Masculino	25	9 (50%)	15 (48,4%)
Edad	Mínimo - Máximo	12,6 - 48,3	16,5 - 48,1	12,6 - 47,1
	Media ± SD	29,8 ± 10,2	34,3 ± 8,7	27,3 ± 10,3

*SD: desviación estándar

Los pacientes alérgicos se distribuyeron en dos grupos de 21 (grupo activo) y de 10 pacientes (grupo control). La edad media fue similar en ambos grupos (26,1 años en el primer grupo y 29,5 en el segundo), por lo que al compararlas mediante la T de Student no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,414$). Igualmente el análisis de la frecuencia de sexos femenino y masculino en los dos grupos mediante la prueba Chi Cuadrado no mostró diferencias significativas estadísticamente ($p=0,518$).

TABLA XII. Variables demográficas de los pacientes alérgicos

		Total	Control	Activo
N		31	10	21
Sexo	Femenino	15	4 (40%)	11 (52,4%)
	Masculino	16	6 (60%)	10 (47,6%)
Edad	Mínimo - Máximo	12,6 - 47,1	13,5 - 47,1	12,6 - 45,6
	Media ± SD	27,3 ± 10,3	29,5 ± 11,1	26,1 ± 10,0

II. PERFIL DE SENSIBILIZACIÓN A ALÉRGENOS DE GRAMÍNEAS Y OLIVO EN LA PROVINCIA DE CIUDAD REAL

El análisis de la reactividad a alérgenos de olivo (Ole e 1, Ole e 7 y Ole e 9), a alérgenos de gramíneas (Phl p 5 y Phl p1) y a panalergenos (Pho d 2, Che a 3 y Pru p 3) se muestra en la tabla XIII.

TABLA XIII. Niveles de IgE específica (UI/ml). Se consideran positivos los valores > 0,35 UI/ml. Sensibilización: O (olivo), G (gramíneas), OG (olivo+gramíneas), OGP (olivo+gramíneas+panalergenos), GP (gramíneas+panalergenos), O Menor (sensibilización sólo a alérgeno menor de olivo), - (sin sensibilización a ninguno de los alérgenos testados).

Paciente	Sensibilización	Ole e 9	Ole e 1	Ole e 7	Phl p 1	Phl p 5	Pho d 2	Che a 3	Pru p 3
1	OG	0,05	13,00	0,01	71,01	44,99	0,03	0,00	0,00
2	OGP	0,12	11,14	0,06	122,97	381,98	0,03	0,00	44,65
3	OGP	1,52	8,48	-	0,00	6,91	21,80	0,00	6,37
4	OG	0,01	11,48	0,03	38,25	54,24	0,03	0,00	0,00
5	OG	0,00	22,57	0,72	14,31	0,44	1,96	0,00	0,00
6	OG	0,09	60,30	0,06	153,73	250,88	0,02	0,00	0,00
7	OG	0,00	11,44	0,02	2,25	0,00	0,01	0,00	0,00
8	OG	0,00	1,61	0,00	0,55	0,00	0,00	0,00	0,00
9	G	0,01	0,07	0,00	30,47	0,15	0,00	0,00	0,00
10	OG	0,10	220,00	0,13	30,72	0,00	0,01	0,00	0,00
11	OGP	0,01	0,76	0,00	47,12	44,19	2,30	0,00	0,00
12	OGP	23,34	38,13	0,04	0,04	66,81	0,03	24,84	0,00
13	OG	0,00	0,38	0,00	0,76	0,00	0,02	0,00	0,00
14	GP	0,01	0,03	0,00	7,46	7,49	8,13	0,00	0,00
15	OG	0,04	23,34	0,02	68,42	138,00	0,03	0,00	0,00
16	G	0,03	0,13	-	8,73	3,76	0,06	0,05	0,03
17	OG	0,01	1,41	0,00	26,99	0,03	0,06	0,00	0,00
18	G	0,01	0,00	0,00	13,32	0,01	0,02	0,00	0,00
19	OG	0,00	0,47	0,02	0,96	0,00	0,01	0,00	0,00
20	OG	0,00	13,91	0,02	10,67	0,00	0,09	0,00	0,00
21	-	0,01	0,00	0,00	0,06	0,21	0,04	0,00	0,00
22	OGP	0,03	1,98	-	0,06	45,64	31,52	0,01	1,26
23	OG	0,00	3,05	0,00	30,44	0,00	0,00	0,00	0,00
24	OG	0,04	28,41	0,41	5,14	0,00	0,00	0,00	0,00
25	OGP	0,02	4,46	0,00	25,27	41,67	22,69	0,00	0,00
26	O Menor	0,00	0,00	20,27	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00
27	G	0,00	0,00	0,00	22,34	16,60	0,01	0,00	0,00
28	OGP	0,03	3,38	0,00	35,80	0,02	0,03	0,00	0,89
29	OG	0,10	85,56	-	168,32	0,09	0,01	0,03	0,01
30	GP	0,00	0,13	0,00	29,57	16,10	0,77	0,00	0,00
31	O	0,00	25,02	0,02	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00

De los 31 pacientes alérgicos estudiados, 23 estaban sensibilizados a Ole e 1 (74,2%) y 25 a Phl p 5 (80,6%), comportándose estos dos alérgenos como alérgenos mayores en la población estudiada. Le sigue en frecuencia de reconocimiento por parte de nuestra población alérgica Phl p 1, frente al que 15 de los pacientes (48,4%) presentaban niveles de IgE específica mayores de 0,35 UI/L. Sin embargo, sólo un pequeño número de pacientes estaban sensibilizados a Ole e 7 y a Ole e 9. Igualmente,

la frecuencia global de reconocimiento a panalergenos fue baja.

En conjunto, 24 de los pacientes (77%) estaban sensibilizados a olivo y 28 a gramíneas (90%). La mayoría estaban polisensibilizados a olivo y gramíneas (71%), y sólo 8 pacientes (26%) estaban monosensibilizados, 6 a gramíneas (20%) y 2 a olivo (6%). Uno de los pacientes incluido en el estudio presentó niveles de IgE específica inferiores a 0,35 UI/L frente a todos los alérgenos estudiados (paciente 21).

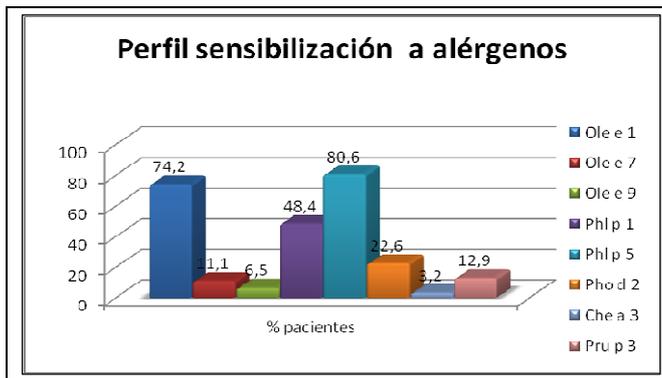


FIGURA XIV. Panel de sensibilización a panalergenos y a alérgenos mayores y menores de olivo y gramíneas.

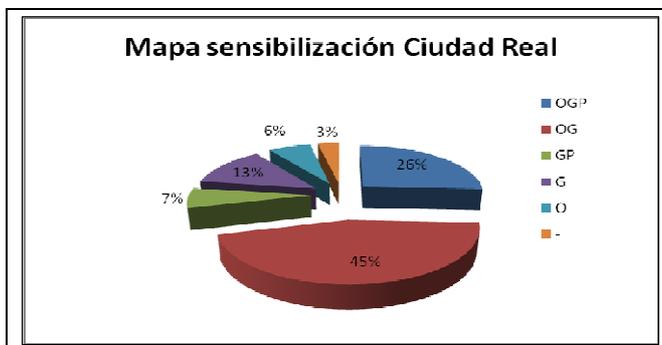


FIGURA XV. Mapa sensibilización Ciudad Real

Por otro lado, de los 24 pacientes sensibilizados a olivo, 20 estaban sensibilizados a un sólo alérgeno de los 3 estudiados (en todos los casos Ole e 1, excepto uno de los pacientes, que estaba sensibilizado sólo a Ole e 7), 4 estaban sensibilizados a 2 alérgenos y ninguno a los 3 alérgenos. En el caso de los pacientes alérgicos a gramíneas, 16 estaban sensibilizados a 1 sólo alérgeno de los 2 estudiados y 12 a los dos.

TABLA XIV. Patrón reactividad IgE alérgeno-específica.

Perfil de reactividad IgE específica	Nº Pacientes sensibilizados a Olivo (%)	Nº Pacientes sensibilizados a Gramíneas (%)
Un alérgeno	20 (83,3)	16 (51,6)
Dos alérgenos	4 (16,6)	12 (38,7)
Tres alérgenos	0 (0)	-

III. BALANCE ENTRE CÉLULAS TREG Y LINFOCITOS TH EN PACIENTES ALÉRGICOS CON RESPECTO A INDIVIDUOS NO ATÓPICOS

III.I. FUNCIÓN DE LINFOCITOS TH

Como sugieren los diagramas de caja de la figura XVI, tras la estimulación in vitro con alérgenos polínicos, el grupo P presentaba un porcentaje superior de linfocitos T CD4 productores de IL-4 (perfil Th2) con respecto al grupo de pacientes no alérgicos (grupo CNA), ya que tanto el valor de la mediana (24,2% en el primer grupo frente a 8,45% en el segundo) como la caja están más desplazadas hacia arriba en los pacientes alérgicos.

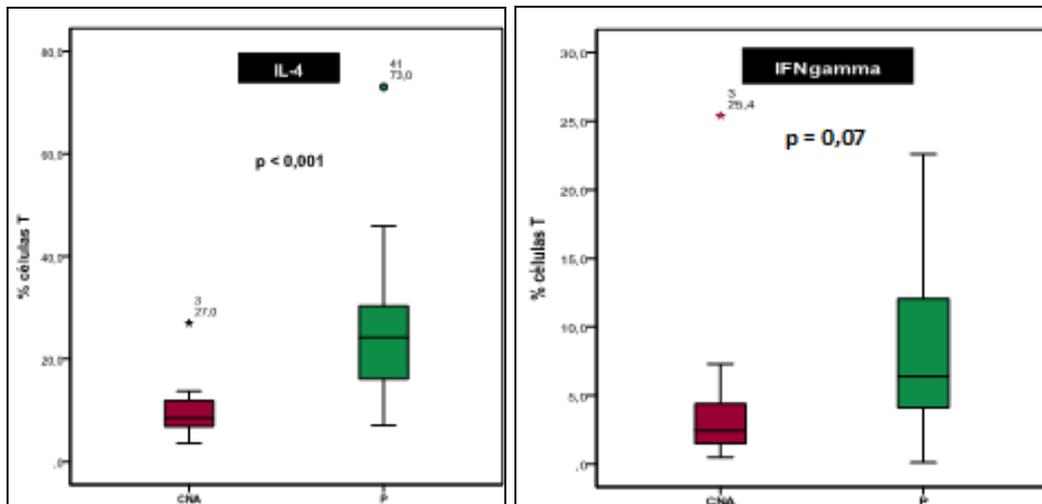


FIGURA XVI. Linfocitos TCD4 productores de IL-4 (izquierda) e IFN γ (derecha).

La comparación del porcentaje de estos linfocitos en los dos grupos mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, mostró que existe una diferencia muy significativa entre los valores de ambos grupos ($p < 0,001$).

La mediana del porcentaje de linfocitos T CD4 productores de IFN- γ (perfil Th1) también fue mayor en el grupo de pacientes alérgicos (6,40%) con respecto a la del grupo control (2,45%), sin embargo esta diferencia no alcanzó la significación estadística ($p=0,07$).

III.2. CÉLULAS TREG.

El porcentaje de linfocitos TCD4 con fenotipo supresor que expresan el factor de transcripción Foxp3 fue también superior en el grupo de pacientes alérgicos (Figura XVII). La mediana en este grupo es de 27,3%, mientras que en el grupo de los controles no alérgicos es de 11,9% ($p=0,002$).

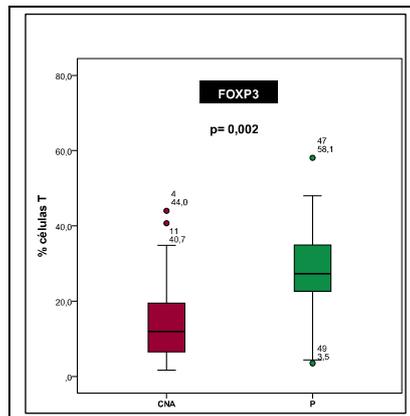


FIGURA XVII.
Linfocitos TCD4 Foxp3+

En cuanto al porcentaje de linfocitos TCD4 que producen citoquinas supresoras, hubo diferencias muy significativas en los niveles de linfocitos que producen TGF- β ($p < 0,001$), siendo mayor el valor en el grupo P. Las medianas obtenidas fueron de 7,90% en el caso de los pacientes del grupo P y de 2,80% en el caso del grupo CNA (Figura XVIII).

Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el caso del porcentaje de linfocitos TCD4 que producen IL-10 ($p=0,885$). Las medianas en ambos grupos eran similares (2,50% en el grupo P y 2,90% en el grupo CNA).

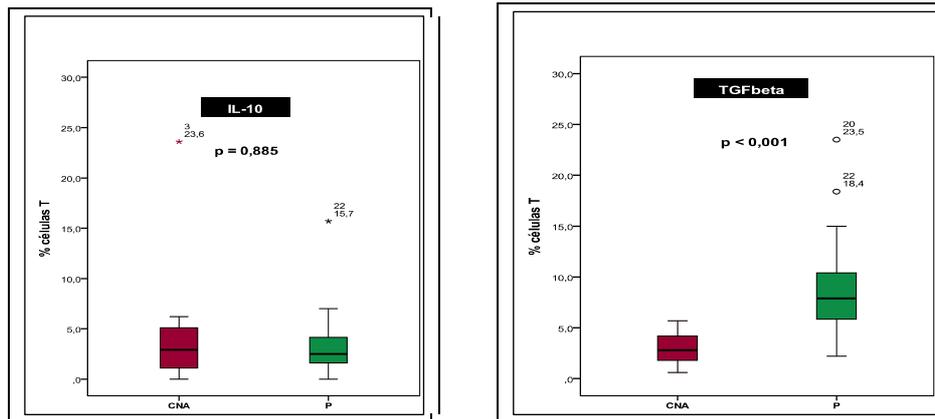


FIGURA XVIII. Linfocitos TCD4 productores de citoquinas supresoras.

IV. CAMBIOS INMUNOLÓGICOS INDUCIDOS POR EL TRATAMIENTO CON ITE EN EL GRUPO DE PACIENTES ALÉRGICOS

IV.1. FUNCIÓN DE LINFOCITOS TH2

Dos de los pacientes del grupo A abandonaron el estudio, por lo que finalmente fueron 19 los sujetos alérgicos que recibieron tratamiento con ITE.

En este grupo, se observó un marcado descenso del porcentaje de linfocitos T CD4 productores de IL-4 a los 6 meses del inicio del tratamiento, disminuyendo el valor de la mediana del 25,30% de linfocitos TCD4 totales al 8,80% (Figura XIX). El análisis de los datos mediante el test no paramétrico T de Wilcoxon, mostró que, en este grupo, el descenso de linfocitos T CD4 productores de IL-4 a los 6 meses era estadísticamente significativo ($p=0,005$).

Al año del inicio del tratamiento, se produjo un aumento en los valores de esta subpoblación de linfocitos, alcanzando un valor de la mediana del 15,1%. Sin embargo, este aumento no llegó a ser estadísticamente significativo con respecto a los valores de T2 ($p = 0,173$), aunque seguía siendo significativamente menor que el valor inicial (T1) ($p=0,019$).

En el grupo control, por el contrario, los valores de linfocitos T CD4 productores de IL-4 al inicio del estudio y a los 6 meses del inicio de la ITE en el grupo

activo, eran muy similares (valores de la mediana: 20,05% y 25,65% en T1 y en T2, respectivamente), por lo que no se observaron diferencias estadísticamente significativas tras aplicar el test de Wilcoxon para muestras apareadas ($p=0,333$).

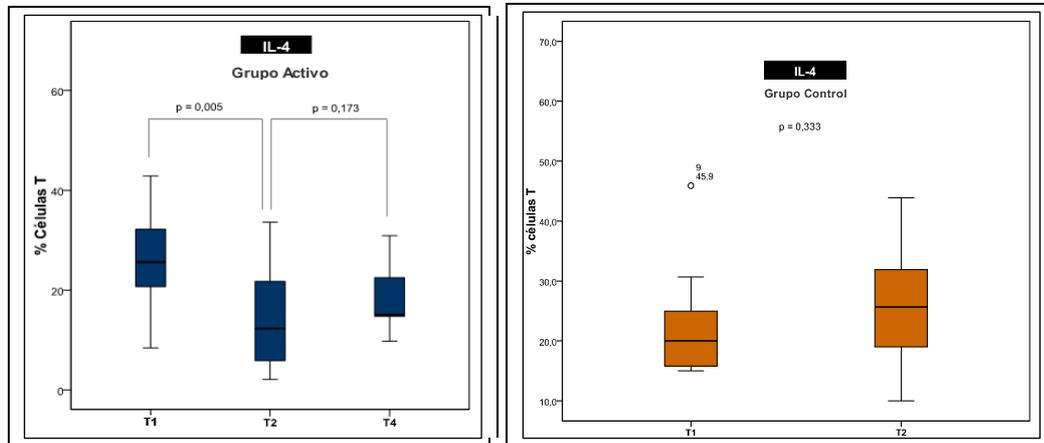


FIGURA XIX. Linfocitos TCD4 productores de IL-4. Valoración intragrupo.

Al realizar el análisis intergrupo mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, se observó que antes de administrar la vacuna, no había diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,313$), mientras que a los 6 meses del inicio del tratamiento el porcentaje de linfocitos TCD4 productores de IL-4 era menor en el grupo activo, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,012$) (Figura XX).

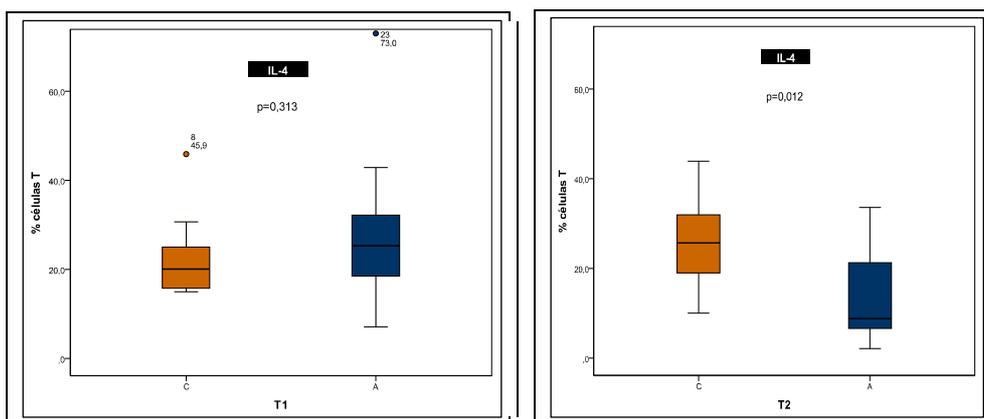


FIGURA XX. Linfocitos TCD4 productores de IL-4. Valoración intergrupo.

IV.2. FUNCIÓN DE LINFOCITOS TH1

Antes de iniciar el tratamiento con ITE, la mediana del porcentaje de linfocitos TCD4 productores de IFN- γ en el grupo A era del 5,60% del total de linfocitos TCD4, aumentando al 16,20% a los 6 meses del inicio del tratamiento (Figura XXI). El análisis de los datos mediante la prueba T de Wilcoxon mostró que esta diferencia era estadísticamente significativa ($p=0,001$).

Seis meses después (al año del inicio de la ITE), el porcentaje de esta subpoblación de linfocitos disminuyó levemente en el grupo A, a un valor de la mediana del 13,50%, por lo que no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores de T2 ($p=0,334$), aunque sí con los de T1 ($p=0,001$).

En el grupo C, la mediana del porcentaje de linfocitos TCD4 productores de IFN- γ a los 6 meses del inicio de la ITE en el grupo A disminuyó levemente (7,45%) con respecto al valor al inicio del estudio (10,30%), no siendo significativa la diferencia ($p=0,139$).

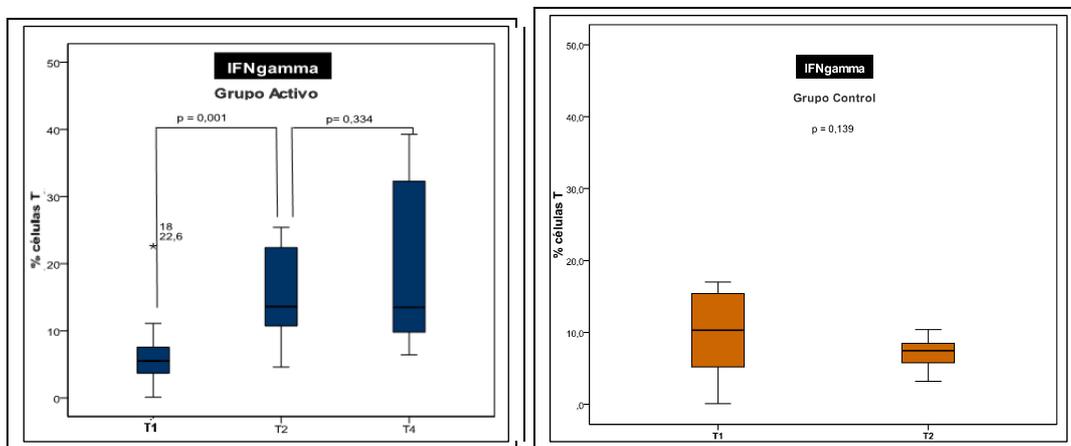


FIGURA XXI. Linfocitos TCD4 productores de IFN- γ . Valoración intragrupo.

Al comparar los niveles de estos linfocitos entre el grupo A y el grupo C al inicio del estudio (T1) y a los 6 meses del inicio del tratamiento (T2) mediante la prueba U de Mann-Whitney, se observó que en T1 no había diferencias estadísticamente significativas ($p=0,183$). Sin embargo, en T2, debido al aumento en los valores en el grupo A, la diferencia fue muy significativa ($p < 0,001$) (Figura XXII).

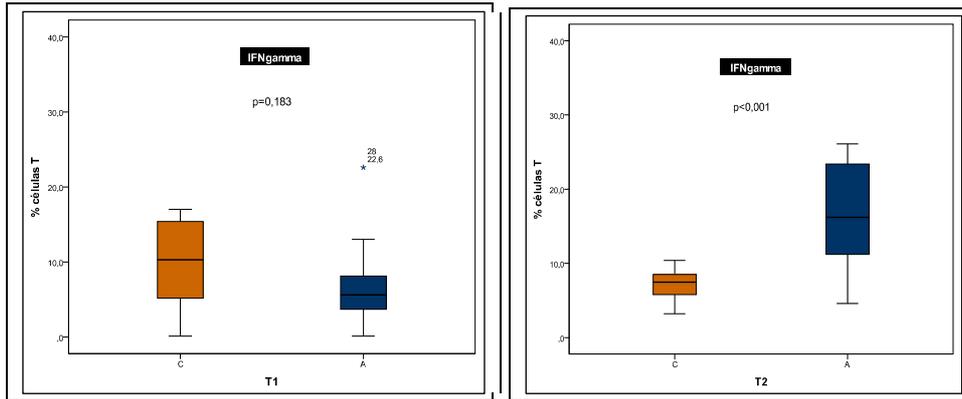


FIGURA XXII. Linfocitos TCD4 productores de IFN- γ . Valoración intergrupo.

IV.3. CÉLULAS TCD4 FOXP3+

En el grupo A, el porcentaje de linfocitos TCD4 con función inmunomoduladora que expresaban en superficie el factor de transcripción Foxp3 se mantuvo en las distintas etapas del estudio en torno al 30%-35% de los linfocitos TCD4 totales (Figura XXIII). En T1, el valor de la mediana era del 31,80%, en T2 del 32,0% y en T4 del 36,75%. El análisis mediante la prueba T de Wilcoxon estableció que no había diferencias estadísticamente significativa entre los valores de T1 y T2 ($p = 0,952$), de T2 y T4 ($p=0,278$) y de T1 y T4 ($p=0,438$).

En el grupo C, los niveles de estos linfocitos TCD4 eran también muy parecidos en T1 y T2, aunque algo menores, alrededor del 25% del total de linfocitos TCD4 (valores de las medianas: 25,60% en T1 y 26,40% en T2). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en este caso ($p=0,333$).

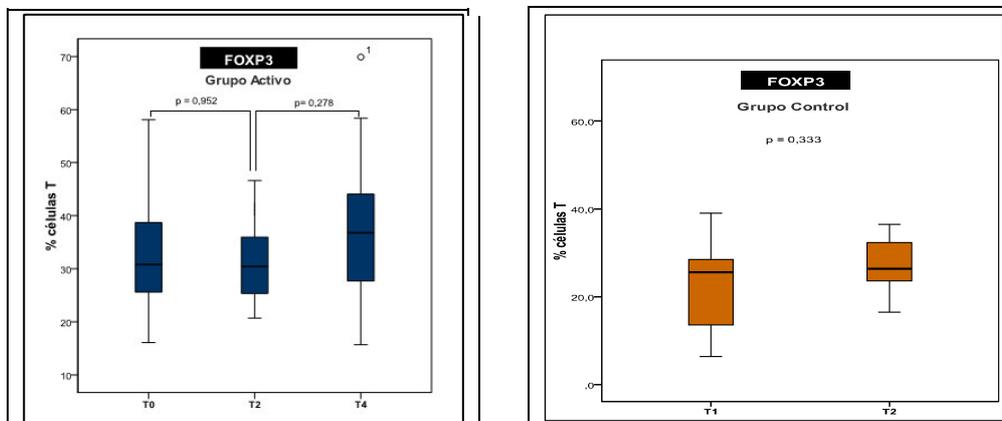


FIGURA XXIII. Linfocitos TCD4 Foxp3+. Valoración intragrupo.

La comparación de los niveles de linfocitos TCD4 Foxp3+ en el grupo A y en el grupo C, en T1 y en T2 no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos casos ($p=0,058$ y $p=0,104$, respectivamente) (Figura XXIV).

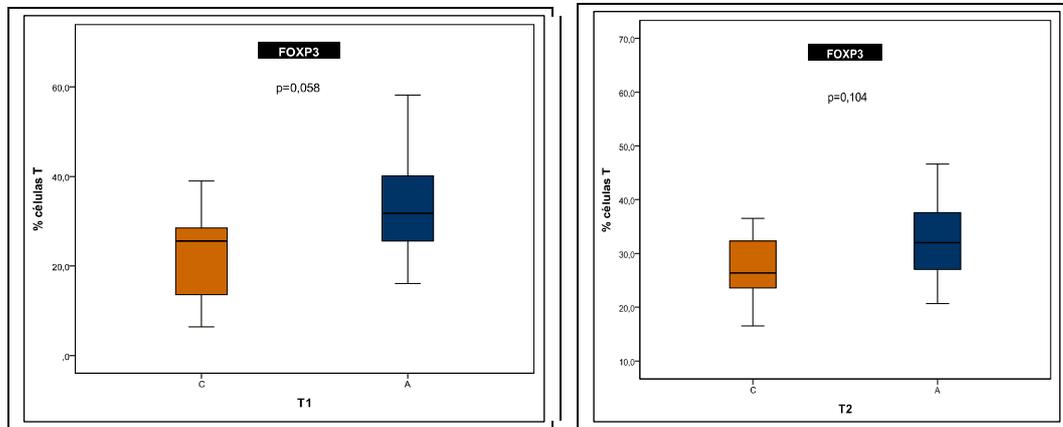


FIGURA XXIV. Linfocitos TCD4 Foxp3+. Valoración intergrupo.

IV.4. CÉLULAS TCD4 PRODUCTORAS CITOQUINAS SUPRESORAS

IV.4.1. CÉLULAS TCD4 PRODUCTORAS DE IL-10

En el grupo activo, se produjo a los 6 meses del inicio del tratamiento con ITE, un notable aumento en el porcentaje de células TCD4 que expresaban en el citoplasma IL-10: la mediana pasó de un valor inicial en T1 del 2,50% de células TCD4 totales a un 13,50% en T2 (Figura XXV). Este aumento fue estadísticamente muy significativo ($p < 0,001$). Al año de administrar la vacuna, los niveles de estos linfocitos aumentaron ligeramente hasta un valor de la mediana del 18,0%. Sin embargo este aumento no fue significativo con respecto a los valores de T2 ($p= 0,158$), pero sí en comparación con los de T1 ($p=0,001$).

En el grupo control, los niveles de linfocitos TCD4 que contenían IL-10 en el citoplasma fueron similares al inicio del estudio y a los 6 meses de administrar la vacuna (2,35% y 3,60%, respectivamente). Al aplicar el test de Wilcoxon para muestras apareadas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,959$).

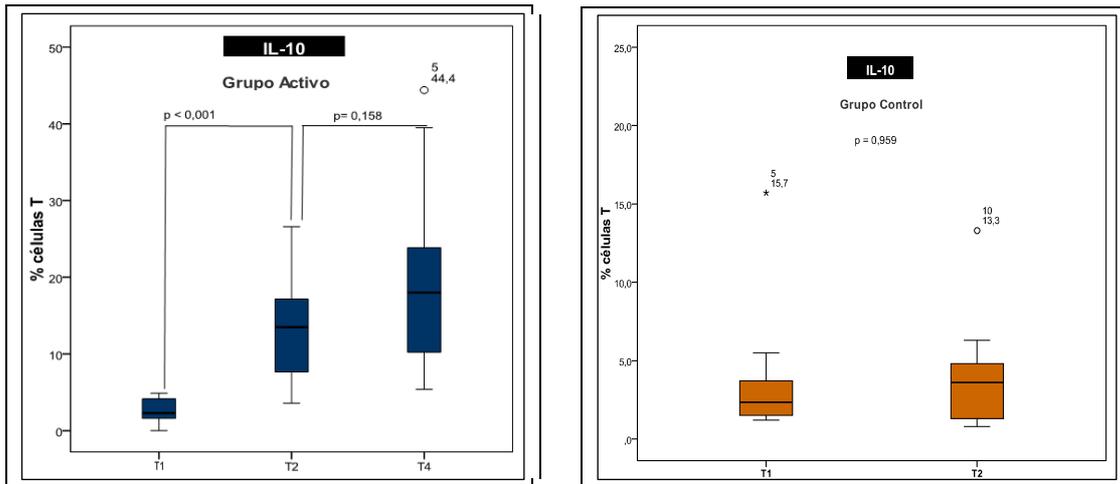


FIGURA XXV. Linfocitos TCD4 productores de IL-10. Valoración intragrupo.

Al comparar los valores de los dos grupos mediante la U de Mann-Whitney, no se observaron diferencias en T1 ($p=0,783$), pero sí en T2 ($p < 0,001$), debido fundamentalmente al incremento en los niveles de estos linfocitos en el grupo activo a los seis meses del inicio de la ITE (Figura XXVI).

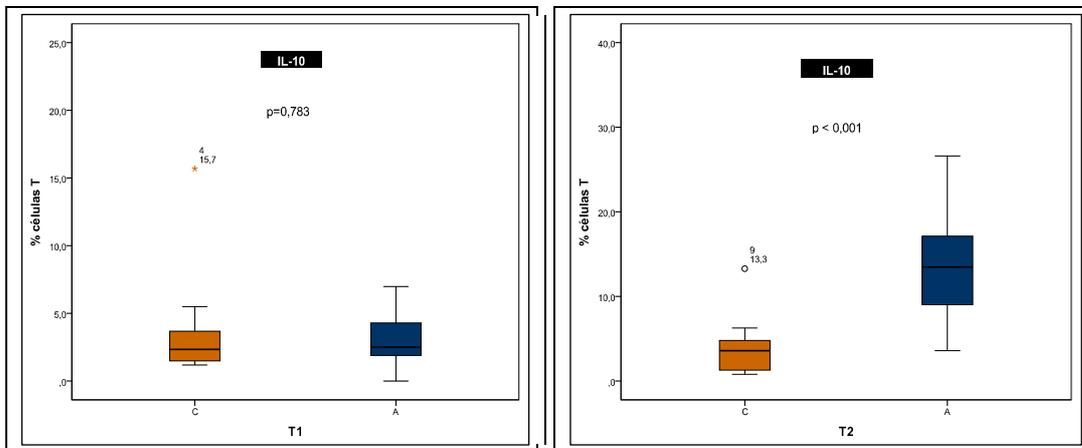


FIGURA XXVI. Linfocitos TCD4 productores de IL-10. Valoración intergrupo.

IV.4.2. CÉLULAS TCD4 PRODUCTORAS DE TGF- β

Los resultados obtenidos para los linfocitos TCD4 productores de TGF- β son similares a los obtenidos para los linfocitos TCD4 productores de IL-10.

En el grupo activo, se produjo a los 6 meses de iniciar el tratamiento, un

aumento importante y muy significativo estadísticamente ($p < 0,001$) en el porcentaje de linfocitos TCD4 que expresaban en su citoplasma TGF- β (mediana en T1 del 8% de linfocitos TCD4 totales y en T2 del 28,20%). Al año de administrar la vacuna, a diferencia de los linfocitos TCD4 IL-10+, se observó de nuevo un aumento en el porcentaje de los linfocitos TCD4 TGF- β +, que sí llegó a ser en este caso estadísticamente significativo con respecto a T2 ($p=0,008$) (y por supuesto con respecto a los valores de T1, $p=0,002$).

En el caso del grupo control, al igual que para los linfocitos TCD4 IL-10+, los valores de linfocitos TGF- β en T1 y T2 fueron similares (medianas: 7,70% y 13,10% respectivamente), por lo que no se observaron diferencias estadísticamente significativas al aplicar el test de Wilcoxon ($p=0,445$) (Figura XXVII).

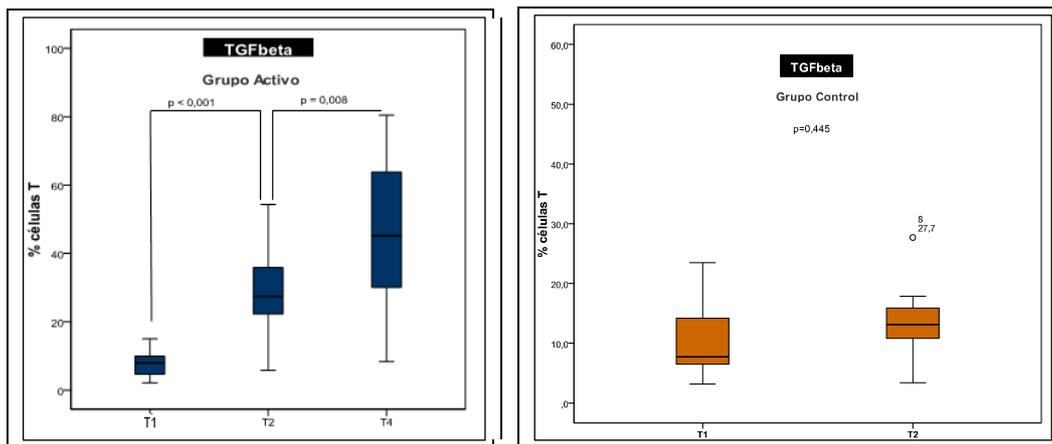


FIGURA XXVII. Linfocitos TCD4 productores de TGF- β . Valoración intragrupo.

Lógicamente al comparar los valores entre el grupo A y el grupo C, y teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, en T1 no se observaron diferencias significativas estadísticamente entre ambos grupos ($p=0,535$), pero sí a los 6 meses de iniciar el tratamiento ($p=0,001$) (Figura XXVIII).

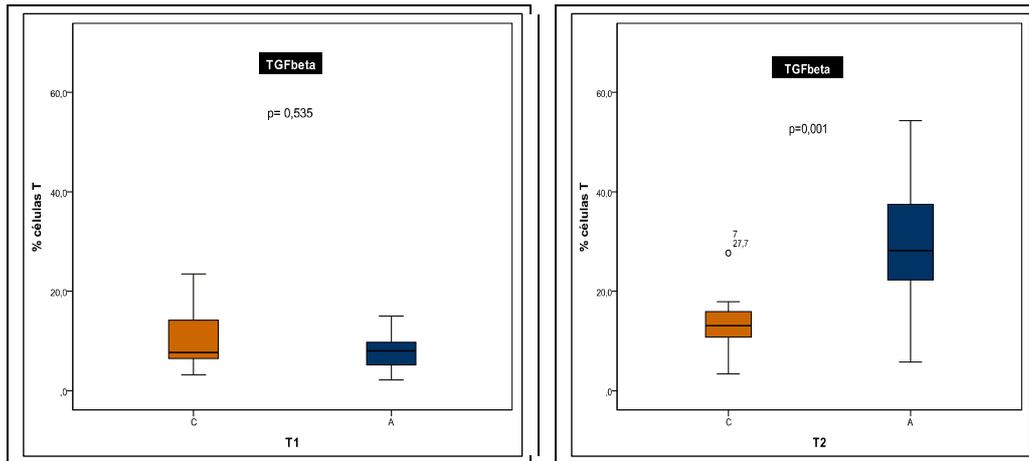


FIGURA XXVIII. Linfocitos TCD4 productores de TGF-β. Valoración intergrupo.

IV.5. CÉLULAS TCD4 CD152+

Con respecto al porcentaje de células TCD4 que expresaban la molécula CD152 (CTLA4), no se observaron diferencias entre los niveles medidos en el grupo activo en T1, T2 y T4. Lo mismo ocurrió para el grupo control.

Cuando se realizó la comparación entre ambos grupos en T1 y en T2, no se detectaron diferencias significativas en ninguno de los dos casos ($p=0,836$ y $p=0,801$, respectivamente).

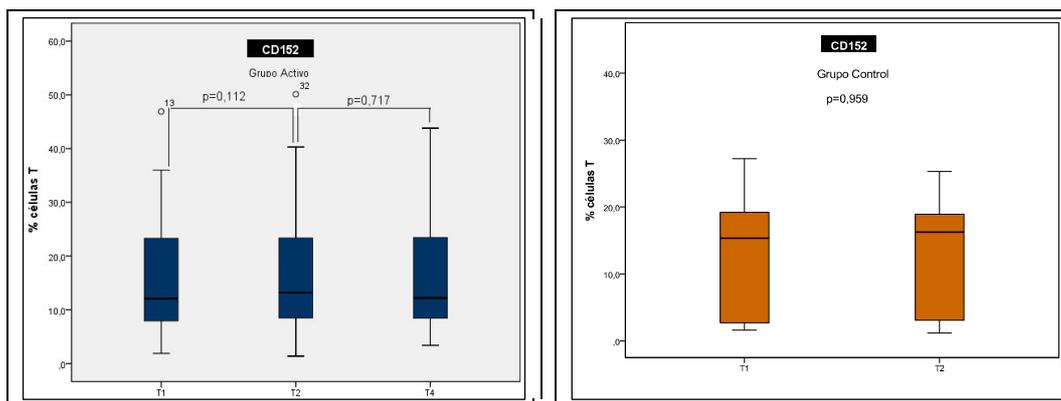


FIGURA XXIX. Linfocitos TCD4 CD152+. Valoración intragrupo.

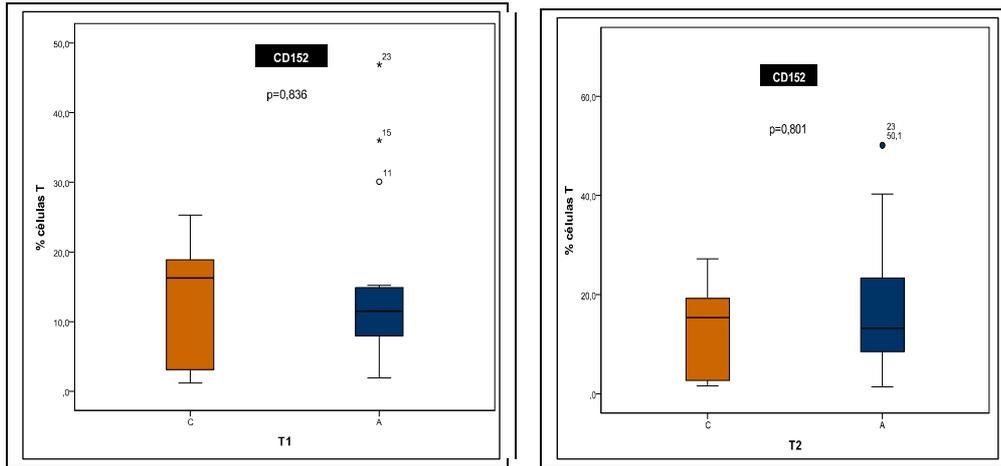


FIGURA XXX. Linfocitos TCD4 CD152+. Valoración intergrupo.

IV.6. CÉLULAS TCD4 CD154+

En el grupo activo, se detectó a los 6 meses y al año de iniciar el tratamiento, una disminución marcada en el número de células que expresaban CD40L. Sin embargo, en el grupo utilizado como control los niveles medidos en T2 fueron similares a los medidos en T1 (figura XXXI).

La comparación de los niveles de CD40L en ambos grupos mostró que mientras que en T1 eran similares, en T2 había diferencias estadísticamente significativas ($p=0,001$) entre los valores del grupo A (mediana: 1,50%) y del grupo C (mediana: 3,55%) (figura XXXII).

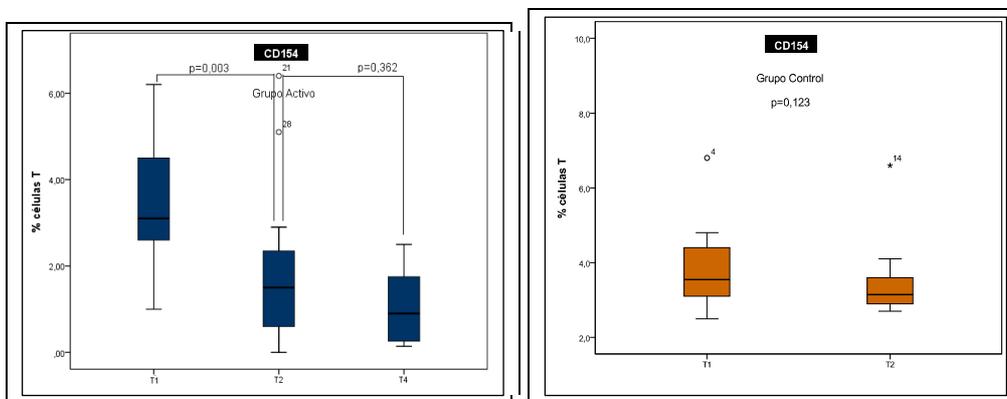


FIGURA XXXI. Linfocitos TCD4 CD154+. Valoración intragrupo.

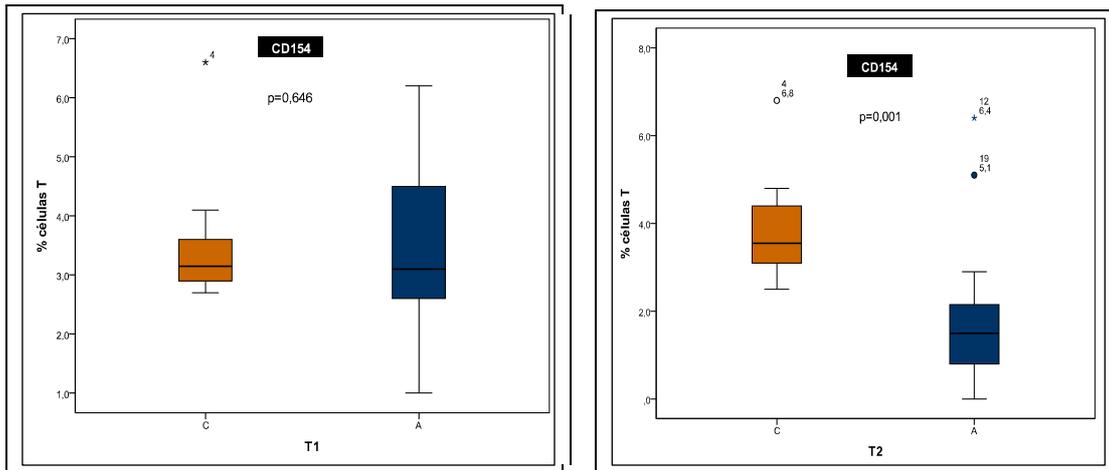


FIGURA XXXII. Linfocitos TCD4 CD154+. Valoración intergrupo.

IV.7. ACTIVACIÓN DE BASÓFILOS

Los resultados del test de activación de basófilos fueron parecidos a los que se obtuvieron para el CD40L: en T1 el porcentaje de basófilos activados fue similar en ambos grupos (figura XXXIV); en T2 se observó en el grupo activo, a diferencia del grupo control, una disminución pronunciada en el número de basófilos activados (figura XXXIII) y una diferencia muy significativa ($p < 0,001$) con respecto al número de basófilos del grupo C. En este último grupo, igual que con CD40L, no se observaron diferencias en los niveles medidos en T1 y en T2.

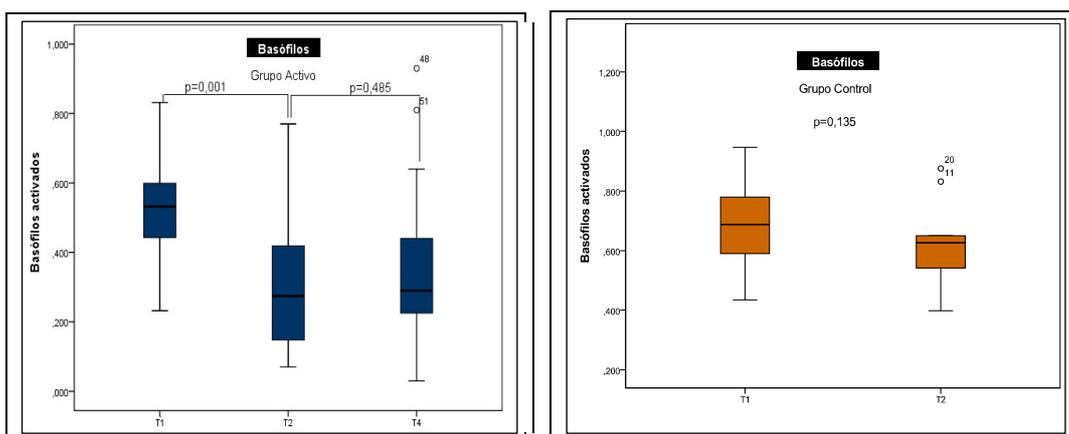


FIGURA XXXIII. Activación de basófilos (en tanto por uno). Valoración intragrupo.

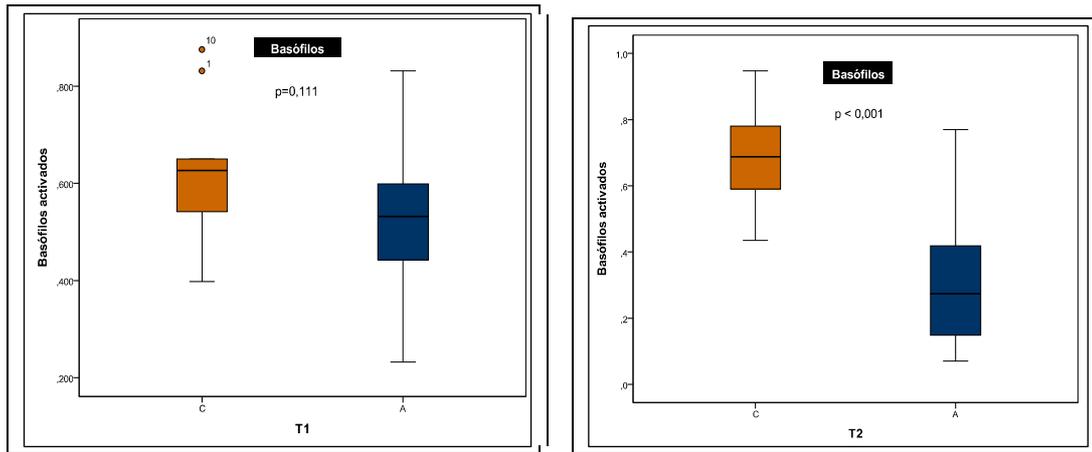


FIGURA XXXIV. Activación de basófilos (en tanto por uno). Valoración intergrupo.

V. PARÁMETROS CLÍNICOS

V.1. PRUEBAS CUTÁNEAS

Los test cutáneos con olivo y gramíneas se realizaron en los dos grupos de pacientes alérgicos en T0. En T0 todos los pacientes presentaban diámetros de pápula mayores de 3 para ambos extractos, excepto uno de ellos, que sólo presentó positividad para gramíneas.

Antes de iniciar el tratamiento, los diámetros de pápulas fueron similares en ambos grupos, tanto para los test cutáneos realizados con extractos de olivo, como con los de gramíneas, no observándose diferencias estadísticamente significativas (figura XXXV).

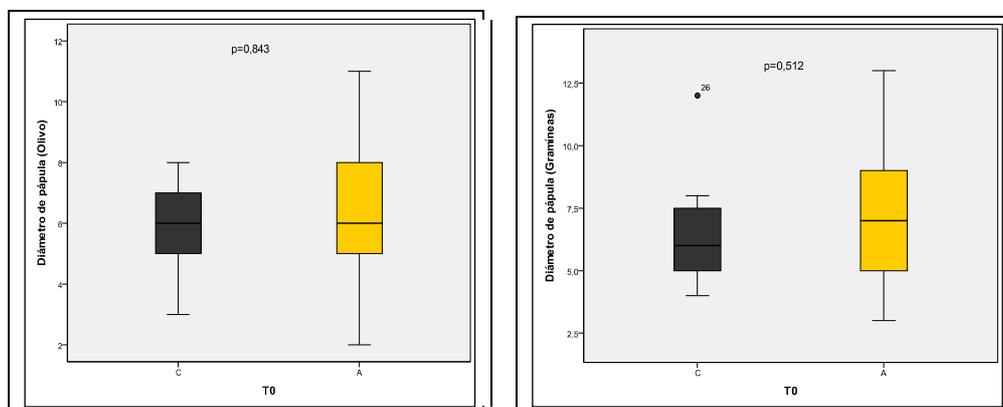


FIGURA XXXV. Valores de las pruebas cutáneas en T0 para olivo y gramíneas

Sin embargo, a los 6 meses, se observaron diámetros de pápulas en los pricks cutáneos de gramíneas menores en el grupo de pacientes alérgicos en tratamiento con ITE, respecto a los medidos en los pacientes del grupo control, aunque esta diferencia no llegó a ser estadística significativa (figura XXXVI).

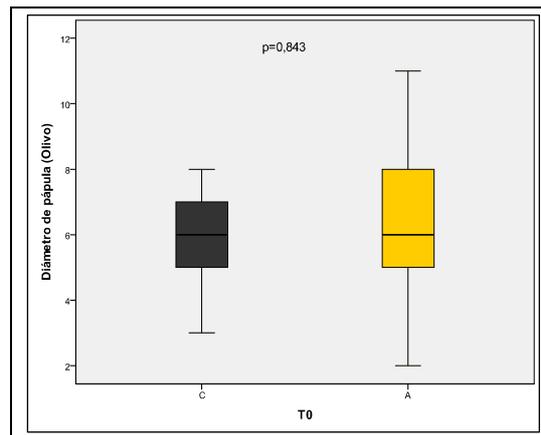


FIGURA XXXVI. Valores de las pruebas cutáneas en T2 para gramíneas.

VI.2. CRD

Al valorar las puntuaciones de los CRD en T3, se encontró que aunque en el grupo activo se obtuvo una puntuación menor que en el grupo control (127,5 vs 164,9), esta diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa ($p=0,823$)

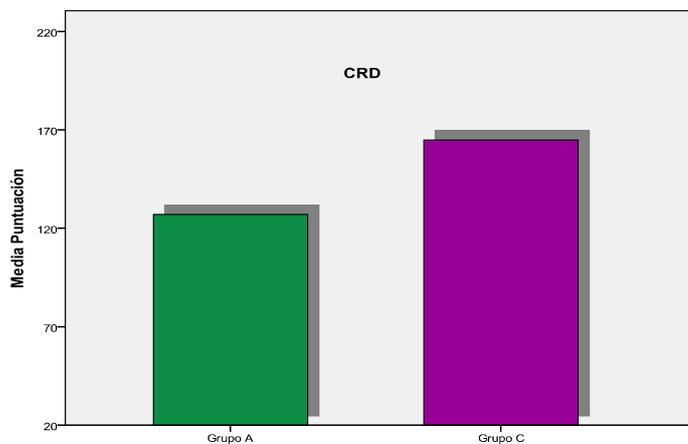


FIGURA XXXVII. Puntuaciones totales de los CRD

VI.3. CUESTIONARIO mini-AQLQ

Tras analizar, a los 6 meses de iniciar el tratamiento con ITE, las puntuaciones de todos los ítems del cuestionario mini-AQLQ en los dos grupos de pacientes alérgicos, se observó una puntuación total mayor en el grupo de pacientes que recibió tratamiento con ITE con respecto a la obtenida en el grupo control (valores de las medianas: 90 y 69, respectivamente). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Igualmente, el análisis individual de las puntuaciones de cada dimensión del cuestionario (síntomas, función emocional, estímulos ambientales, y limitación de actividades cotidianas) mostró en todos los casos una puntuación mayor para el grupo en tratamiento con ITE con respecto al grupo control, sin alcanzar en ninguno de los casos la significación estadística.

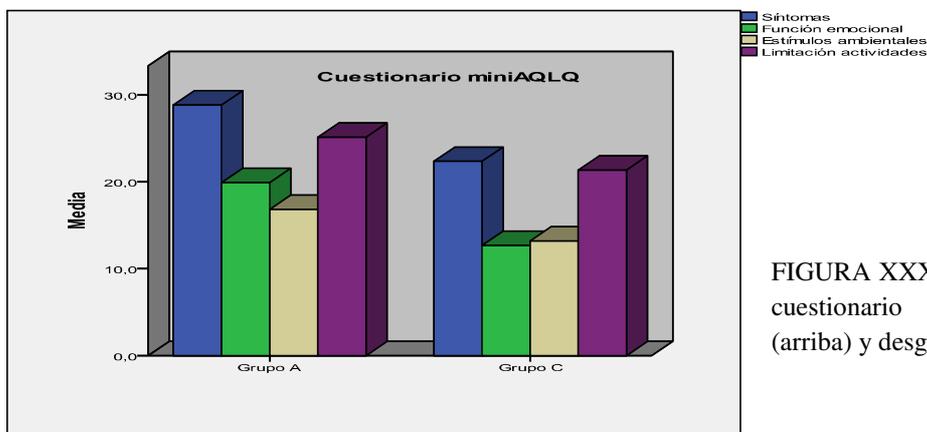
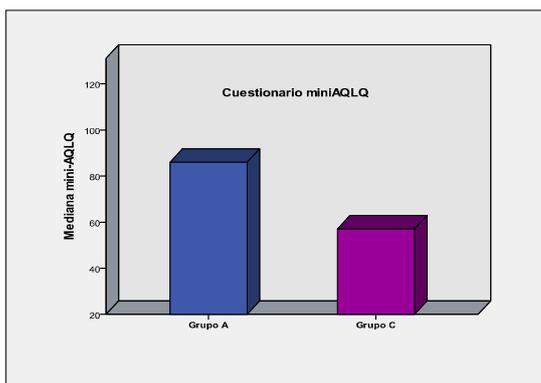


FIGURA XXXVIII Puntuaciones del cuestionario mini-AQLQ total (arriba) y desglosado (abajo)

DISCUSIÓN

I. MAPA DE SENSIBILIZACIÓN DE PACIENTES ALÉRGICOS A OLIVO Y/O GRAMÍNEAS EN CIUDAD REAL

Determinar el perfil de sensibilización individual de cada paciente es importante para discriminar entre sensibilización y alergia verdadera y poder establecer un diagnóstico adecuado.

Para identificar al alérgeno causante de la alergia y conocer si existe co-sensibilización a varios alérgenos del extracto o a varios extractos debido a la sensibilización a componentes que producen reactividad cruzada, como los panalergenos, es fundamental determinar los niveles de IgE específica a alérgenos purificados o recombinantes, y no basar el diagnóstico sólo en las pruebas cutáneas, que utilizan extractos naturales ¹⁶². Es frecuente encontrar en la práctica diaria sueros de pacientes con test cutáneos positivos frente a varios extractos alergénicos, que responden a sólo un alérgeno mayor y a un panalergeno cuando se testan in vitro con alérgenos purificados o recombinantes. La similitud entre las secuencias de estos panalergenos es la responsable de la positividad a un amplio panel de extractos naturales, en los cuales al menos uno de los alérgenos comparte epítomos en la IgE con la molécula de panalergeno sensibilizante ¹⁶³. Esto obliga a confirmar los resultados de las pruebas cutáneas en pacientes sensibilizados a varios extractos mediante determinaciones in vitro de IgE específica.

Una vez conocido el perfil de sensibilización de cada paciente, se selecciona el extracto de ITE más conveniente para el paciente según las guías farmacoterapéuticas actuales. Lo ideal sería personalizar el tratamiento, y poder incluir en las vacunas sólo los alérgenos a los que el paciente es alérgico. No obstante, la ITE personalizada es todavía un proyecto distante: hoy en día sólo es posible comercializar productos conteniendo un número predefinido de moléculas alérgicas relevantes a la mayoría de los pacientes ¹⁶⁴. Aún así, es fundamental realizar un diagnóstico molecular correcto. Además, establecer el perfil de sensibilización también podría ser importante para comprobar si, como ya han propuesto algunos autores ¹⁶⁵, los diferentes perfiles moleculares de sensibilización influyen en la respuesta de los pacientes a las mismas preparaciones de ITE.

I.1. ALÉRGENOS MAYORES Y MENORES

En el diagnóstico molecular de la alergia es importante incluir tres tipos de alérgenos: 1) alérgenos mayores, que son reconocidos por una gran mayoría de la población alérgica, 2) panalergenos, como marcadores de polisensibilización y 3) alérgenos menores, para identificar sensibilización específica a estas moléculas, las cuales son difíciles de detectar con los extractos alérgicos disponibles actualmente.

En nuestro estudio, se han analizado los niveles de IgE específica frente a los alérgenos mayores Ole e 1, Phl p 1 y Phl p 5, los alérgenos menores Ole e 7 y Ole e 9 y los panalérgenos Pho d 2 (profilina y alérgeno mayor de las palmeras), Che a 3 (polcalcina y alérgeno mayor de las chenopodiáceas) y Pru p 3 (LTP presente en el melocotón).

Según las pruebas cutáneas todos los pacientes estudiados, a excepción de uno, estaban polisensibilizados a olivo y a gramíneas. Sin embargo, mediante las determinaciones de IgE específica se pudo comprobar que ocho pacientes presentaban niveles mayores de 0,35 UI/ml sólo frente a uno de los pólenes testados (seis a gramíneas-pacientes 9, 14, 16, 18, 27 y 30- y dos a olivo –pacientes 26 y 31). Esto influyó lógicamente en las decisiones terapéuticas. Los dos pacientes, que tras la determinación de los niveles de IgE, fueron catalogados como monosensibilizados a olivo, recibieron tratamiento con ITE específica de olivo, mientras que los pacientes polisensibilizados, así como los monosensibilizados a gramíneas, recibieron vacunación con una mezcla de gramíneas. En los pacientes sensibilizados a varios pólenes se suelen utilizar vacunas con un solo componente en lugar de vacunas combinadas ya que hasta ahora, no hay ensayos clínicos convincentes que utilicen extractos combinados.

En segundo lugar, los niveles de IgE específica permitieron establecer la frecuencia de reconocimiento de estos alérgenos en la población alérgica estudiada. Como era de esperar, los alérgenos Ole e 1, Phl p 5 y Phl p 1 se comportan como alérgenos mayores, mientras que Ole e 7 y Ole e 9 como alérgenos menores. Estos datos concuerdan con los reportados por otros estudios epidemiológicos realizados en España ^{3, 24, 166}, aunque en áreas geográficas con altos recuentos polínicos, como Córdoba o Jaén, la frecuencia de reconocimiento a alérgenos menores es mayor (en torno al 35%).

Esto se debe a que la sensibilización a estos alérgenos se correlaciona positivamente con los niveles atmosféricos de pólenes ¹⁶⁷. Niveles de exposición elevados contribuyen a una mayor prevalencia de alérgenos menores, mientras que con niveles bajos, los alérgenos mayores son los de mayor potencial sensibilizante.

Estudiar la sensibilización a alérgenos menores es importante porque entre los alérgenos menores se incluyen diversos panalergenos, responsables de fenómenos de reactividad cruzada a pólenes y alimentos. Además, pacientes sensibilizados a algunos alérgenos menores como Ole e 7 (LTP) ¹⁶⁸ y Ole e 9 ¹⁶⁶ presentan una clínica más severa, con un aumento en el riesgo de padecer asma, y un incremento en el riesgo de sufrir reacciones adversas durante el tratamiento con ITE. Entre los objetivos de nuestro estudio no se incluyó la evaluación de la severidad de los síntomas en los pacientes sensibilizados a alérgenos menores debido al pequeño número esperado de pacientes sensibilizados a este tipo de alérgenos en Ciudad Real.

Por último, se corroboró que las gramíneas siguen siendo los pólenes más importantes en Ciudad Real ⁴, por su gran alergenicidad, extensa distribución y prolongada polinización. El olivo es el segundo en importancia desde el punto de vista clínico.

I.2. PANELERGENOS.

Entre los panalergenos conocidos, destacan las profilinas, las polcalcinas y las LTP. Las profilinas y polcalcinas se encuentran en el polen de varias especies, produciendo fenómenos de reactividad cruzada entre pólenes ¹⁶⁹. Además, las profilinas están presentes en diversas frutas y vegetales, siendo responsables del síndrome polen-frutas ¹⁷⁰, en el que la sensibilización a un alérgeno de polen vía inhalada es el origen de alergia alimentaria a diversos vegetales por reactividad cruzada con alguno de sus alérgenos.

Las LTPs son altamente resistentes a la digestión y a la temperatura, lo que las convierte en potentes alérgenos alimentarios, capaces de sensibilizar por vía digestiva y producir reacciones sistémicas, incluso anafilaxias, debido a que llegan al tracto digestivo intactas ^{171,172}. Las LTPs están presentes en el polen de algunas especies

(Ole e 7; Platanus, Pla a 3), en el látex (Hev b 12), y en las frutas, especialmente frutas de la familia *Rosaceae*. En el melocotón, una LTP, Pru p 3, se comporta como alérgeno mayor, sensibilizando aproximadamente al 60% de los alérgicos a dicha fruta en los países mediterráneos¹⁷³. Los pacientes alérgicos al polen tienen mayor riesgo de estar sensibilizados a melocotón que los que no lo son.

La relevancia clínica de los panalergenos en los pacientes polínicos está todavía en debate. Asero y colaboradores¹⁷⁴ sugieren que su importancia es limitada. Si los panalergenos fueran clínicamente relevantes, los pacientes hipersensibles deberían sufrir síntomas alérgicos durante toda la época de polinización. Sin embargo, la mayoría de los pacientes presentan síntomas sólo en el período central, sugiriendo una sensibilización primaria a gramíneas.

No obstante, el diagnóstico mediante la determinación de niveles de IgE frente a panalergenos en alergias respiratorias estacionales puede resultar útil porque ayuda a redefinir los casos de sensibilización múltiple. En nuestro estudio, sin embargo, no se ha encontrado relación entre la presencia de reactividad cruzada en los *prick test* y la sensibilización a panalergenos, o al menos a los panalergenos estudiados. Los pacientes clasificados como polisensibilizados en función de los resultados de las pruebas cutáneas, y que finalmente, tras la determinación de IgE recombinante, fueron tratados como monosensibilizados a uno u otro polen, mostraban niveles de IgE específicas menores de 0.35 UI/ml frente a los panalergenos estudiados. Sólo dos de estos pacientes (paciente 14 y 30) estaban sensibilizados a gramíneas y a panalergenos. Sin embargo, del paciente 30 no pudieron obtenerse datos de pruebas cutáneas en T0.

Por tanto en este caso, el estudio de panalergenos no ha resultado útil para aclarar el mecanismo de producción de las sensibilizaciones múltiples observadas en los *prick test*.

Con respecto al porcentaje de sensibilización a los panalérgenos estudiados, se encontraron porcentajes similares a la literatura^{166, 170} (22,6% para Pho d 2, 3,2% para Che a 3 y 12,9 para Pru p 3).

II. BALANCE ENTRE CÉLULAS TREG Y LINFOCITOS TH EN PACIENTES ALÉRGICOS CON RESPECTO A INDIVIDUOS NO ATÓPICOS

Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos implicados en las respuestas alérgicas, sí ha quedado claro en numerosos estudios que las células Th2 alérgeno-específicas y las citoquinas que producen (fundamentalmente IL4, IL5, IL9 e IL13) juegan un papel fundamental ¹⁷⁵, aceptándose que la alergia se produce por una respuesta Th2 inapropiada hacia los alérgenos implicados

Por el contrario, el fenotipo que presentan los individuos no alérgicos se ha asociado históricamente con un fallo en el reconocimiento del alérgeno (ignorancia inmunológica) o con la expresión de citoquinas Th1 protectoras ¹⁷⁶. Podría esperarse que las respuestas Th1 a los alérgenos provocaran una respuesta inflamatoria, pero, generalmente, no se produce. Por lo tanto, los individuos alérgicos responden a los alérgenos con una respuesta Th2 inflamatoria, mientras que la respuesta inmune de los no alérgicos no es inflamatoria y se asocia con citoquinas Th1.

Ahora bien, sigue sin conocerse por qué algunos individuos desarrollan enfermedades alérgicas debido a una respuesta Th2 y otros, con la misma exposición a los alérgenos, no. La evidencia científica sugiere que la regulación activa es un mecanismo esencial para mantener respuestas periféricas no inflamatorias, y otorga un papel central en el desarrollo de las enfermedades alérgicas a otras células con función inmunorreguladora, las células Treg. Según estudios publicados, estas células tienen la capacidad de suprimir las respuestas Th2 hacia los alérgenos comunes, pudiendo estar este proceso defectuoso en los individuos alérgicos ¹⁷⁷.

Al estimular *in vitro* células sanguíneas con aeroalérgenos o alérgenos alimentarios, la producción de IFN- γ (marcador de Th1), de IL-4 (marcador de Th2) y de IL-10 y TGF- β (citoquinas antiinflamatorias, características de las células Treg) difiere, como era de esperar, entre sujetos alérgicos y no alérgicos. Tanto en individuos sanos como en pacientes alérgicos, se detectan niveles de estas tres subpoblaciones de linfocitos T, siendo diferente la proporción de cada una de ellas. Es decir, el balance entre linfocitos Th1, linfocitos Th2 y células Treg es fundamental para desarrollar o no alergia.

Al inicio de nuestro estudio, se estimularon células nucleadas de pacientes sanos (donantes) y de pacientes alérgicos a gramíneas y/olivo con alérgenos recombinantes (Ole e 1 y Phl p 5). La determinación mediante citometría de flujo de IL-4, IFN- γ , Foxp3, TGF- β e IL-10 permitió comparar los niveles de linfocitos Th1, Th2 y subpoblaciones de células Treg en estos dos grupos de pacientes.

II.1. CÉLULAS T HELPER

La estimulación de las células TCD4+ mostró una mayor proporción de IL-4 en los pacientes alérgicos que en los controles. Sin embargo, no hubo diferencias significativas para la proporción de linfocitos T que expresaban IFN- γ . Estos resultados son consistentes con el predominio ya descrito anteriormente de los linfocitos efectores Th2 en los procesos alérgicos¹⁷⁸⁻¹⁷⁹.

II.2. CÉLULAS TREG

Se han descrito dos subpoblaciones principales de células Treg: las nTreg, que se caracterizan por la expresión del factor de transcripción Foxp3 y por niveles altos de CD25, y las células iTreg, que mantienen su actividad supresora mediante la secreción de citoquinas (fundamentalmente IL10 y TGF- β) y pueden o no expresar Foxp3. El papel que juega cada una de estas subpoblaciones en el desarrollo de las enfermedades alérgicas ha sido un tema muy debatido en la última década.

La mayoría de estudios realizados hasta la fecha con células nTreg definen a este tipo de células como células T CD4+CD25+. Sin embargo, CD25 no es el marcador perfecto de las nTreg debido a que también se expresa en las células T activadas¹⁸¹. La población de células T CD4+CD25+ puede contener un número significativo de células efectoras, especialmente durante la época de polinización. Por el contrario, el fenotipo supresor de las células Treg se asocia con el factor Foxp3¹⁸², que sí es un marcador específico de las nTreg.

Los pocos estudios que han utilizado Foxp3 como marcador de células nTreg, muestran datos discordantes. Xu y cols.¹⁸³ detectan que la frecuencia de células T CD4+CD25+Foxp3+ es menor en los pacientes con rinitis alérgica, mientras que en el

estudio de Han y cols.¹⁸⁴ los pacientes con rinitis alérgica tenían niveles más elevados de células nTreg. No obstante, en ninguno de los casos las diferencias fueron estadísticamente significativas.

Para las citoquinas reguladoras IL-10 y TGF- β , los datos publicados tampoco son coincidentes. Jutel y colaboradores¹⁸⁵ postulan, después de estimular células nucleadas con Der p 1 (alérgeno mayor del ácaro del polvo doméstico) y Bet v 1 (alérgeno del polen de abedul), que los efectos supresores de estas citoquinas en las respuestas alérgeno-específicas pueden ser importantes. Sin embargo, en otros casos¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ no se han encontrado cambios significativos en la proliferación de células productoras de IL-10 y TGF- β tras estimulación *in vitro* con alérgenos recombinantes.

En el presente estudio, se ha utilizado la expresión de Foxp3 en células CD4+ para identificar a las células nTreg. El porcentaje de este tipo de células fue mayor en los pacientes alérgicos que en los controles sanos. La producción de TGF- β fue también significativamente mayor en el primer grupo, aunque los niveles de IL-10 no difirieron entre individuos alérgicos y donantes. Estos resultados muestran que las células T CD4+ de pacientes alérgicos tienen la habilidad de mostrar aspectos reguladores después de la estimulación *in vitro* con alérgenos específicos. Sin embargo, y por razones aún desconocidas, la liberación de citoquinas reguladoras *in vivo* posiblemente no se produce adecuadamente¹⁸⁹. El tratamiento con dosis progresivamente crecientes de alérgenos podría restablecer la función reguladora de estas células *in vivo* y evitar respuestas inmunes inapropiadas.

III. CAMBIOS INMUNOLÓGICOS INDUCIDOS POR EL TRATAMIENTO CON ITE EN EL GRUPO DE PACIENTES ALÉRGICOS

La ITE es el único tratamiento capaz de modular el curso natural de las enfermedades alérgicas¹⁹⁰. Su efecto terapéutico ha sido demostrado en varios estudios randomizados, a doble ciego y controlados con placebo¹⁹¹⁻¹⁹⁴; por un lado, consigue mejorar o incluso provocar la remisión completa de los síntomas alérgicos¹⁹⁵, por otro, previene el desarrollo de nuevas sensibilizaciones alérgicas¹⁹⁶ y de asma bronquial en pacientes con rinitis alérgicas^{197, 198}. Por todo esto, constituye hoy en día el tratamiento de elección para pacientes con rinitis y/o asma inducidos por polen.

Sin embargo, aunque la eficacia clínica de la ITE está bien establecida, los mecanismos inmunológicos implicados no se conocen a ciencia cierta. Se sabe que es fundamental conseguir un estado de tolerancia inmune en el que se produzca tolerancia clínica prolongada a los alérgenos responsables de las manifestaciones alérgicas. Los cambios inmunológicos observados en pacientes que alcanzan este estado de tolerancia inmune afectan a las respuestas de linfocitos T y B, así como a las de mastocitos y basófilos⁸⁷. En particular, la inducción de tolerancia por parte de los linfocitos T es crucial para conseguir el éxito de la terapia. Inicialmente se pensó, debido a que las alergias mediadas por IgE se caracterizan por una respuesta Th2, que la desviación inmune de células Th2 alérgeno-específicas a células Th1 era responsable de la eficacia de la ITE. Sin embargo, datos recientes sugieren que las células Treg, juegan un papel principal en la inducción de tolerancia en los pacientes alérgicos y en la supresión de las células T efectoras alérgeno-específicas¹⁹⁹.

III.1. BALANCE TH1/TH2

La inducción de tolerancia observada tras el tratamiento con inmunoterapia se ha asociado clásicamente con el cambio en la respuesta de linfocitos Th. Wachholz y cols. demuestran en varios estudios que la inmunoterapia inhibe la infiltración de linfocitos TCD4+ y eosinófilos en la mucosa nasal y aumenta significativamente el ratio de células que expresan ARNm de IFN- γ frente a las que expresan ARNm de IL-5 (citoquina Th2)²⁰⁰. Estos resultados sobre la desviación inmune a nivel del ARNm concuerdan con los publicados anteriormente por este grupo²⁰¹ y por Klimek y cols²⁰², quienes detectaron cambios similares en la expresión de citoquinas a nivel proteico. Dichas observaciones corroboran que la inmunoterapia induce, tras el contacto con el alérgeno y a nivel local, un cambio en la expresión de citoquinas desde una respuesta Th2 a una respuesta Th1.

Para explicar este cambio se han propuesto varias hipótesis. Algunos autores afirman que el aumento en la respuesta Th1 observado tras el tratamiento con inmunoterapia se debe al incremento de IL-12 que se observa en estos pacientes²⁰³. La IL-12 es secretada por macrófagos y linfocitos B, y tiene la capacidad de inducir la

proliferación de los linfocitos Th1 e inhibir la de los Th2, así como inhibir el *switch* dependiente de IL4 de IgG a IgE²⁰⁴⁻²⁰⁶. Otros autores, por el contrario, proponen que el aumento de IFN γ observado en los pacientes tratados se debe a la anergia de células T²⁰⁷.

Sea como fuere, no está tan claro que en las células T periféricas se produzca también este cambio Th2->Th1; no todos los estudios publicados han podido confirmar los resultados obtenidos en mucosa nasal²⁰⁸⁻²¹⁰. Otros, como el publicado por Ebner y cols. muestra un cambio de Th2 a Th1 en las células periféricas tras 12 meses de tratamiento con inmunoterapia con pólenes²¹¹. De manera similar, Benjaponpitak y cols, reportan un descenso en la producción del ratio IL4:IFN- γ en pacientes tratados exitosamente con inmunoterapia con pólenes o con ácaros²¹².

Nuestros resultados apoyan la hipótesis que afirma que la inmunoterapia con pólenes produce también en sangre periférica un cambio en la producción de citoquinas de los linfocitos Th, disminuyendo la expresión de citoquinas Th2 y aumentando las de las células Th1.

En nuestro estudio, antes de administrar la inmunoterapia en el grupo activo, los linfocitos Th predominantes en ambos grupos de pacientes alérgicos eran los linfocitos Th productores de IL-4 (linfocitos Th2). Sin embargo, a los 6 meses de iniciar el tratamiento en el grupo A, los niveles de los linfocitos Th2 en este grupo disminuyeron significativamente tanto respecto a los niveles del grupo utilizado como grupo control ($p=0,012$), como a sus niveles antes de iniciar el tratamiento ($p=0,005$). Al año de iniciar el tratamiento, los valores de linfocitos TCD4 productores de IL-4 en el grupo A seguían siendo significativamente menores que al inicio del tratamiento ($p=0,019$).

El porcentaje de linfocitos Th1 en el grupo A aumentó significativamente a los 6 meses y al año de iniciar el tratamiento con respecto a los valores basales ($p=0,001$ en ambos casos). A los 6 meses de iniciar la ITE, la diferencia con respecto a los valores del grupo control fue muy significativa estadísticamente ($p < 0,001$).

En el grupo control, no se observaron ninguno de estos cambios, los niveles de linfocitos Th1 y Th2 se mantuvieron con respecto a sus valores basales.

No obstante, el hecho de que la bibliografía consultada muestre datos tan dispares al estudiar las células T efectoras en sangre periférica, hace pensar que la desviación inmune Th2/Th1 no es necesariamente imprescindible en el éxito de la ITE. Por el contrario, la presencia de células Treg después del tratamiento con ITE sí que podría explicar el éxito de la terapia en los pacientes tratados.

III.2. CÉLULAS TREG

Las células Treg regulan la proliferación/activación de otras células del sistema inmune mediante varios mecanismos. Pueden: 1) secretar citoquinas supresoras, como la IL-10 y el TGF- β , que inhiben directamente la función de las células T y de las células mieloides; 2) competir con las células T efectoras por la IL-2 (debido a que expresan niveles altos de CD25, cadena alfa del receptor de IL-2), provocando la apoptosis de estas células por privación de IL-2; 3) las Treg Foxp3+ pueden funcionar como células citotóxicas y destruir directamente a otras células, de manera similar a las TCD8+ citotóxicas y 4) expresar moléculas en su superficie que pueden interactuar con receptores situados en las células T, dando lugar a un arresto del ciclo celular²¹³.

Entre los distintos tipos de células Treg, las células iTreg, que secretan IL-10 y TGF- β , parecen ser claves en el éxito de la ITE. La IL-10 tiene un número importante de propiedades antialérgicas: modula la producción inducida por IL-4 de IgE por los linfocitos B en favor de IgG4²¹⁴, inhibe la activación dependiente de IgE de los mastocitos²¹⁵, e inhibe la producción de citoquinas en los eosinófilos²¹⁶. Además, la IL-10 suprime la producción de las citoquinas proalérgicas²¹⁷ y puede inducir un estado de hiporrespuesta a los alérgenos o anergia²¹⁸. Esto puede ocurrir debido a que la IL-10 inhibe la fosforilación del CD28 de las células T²¹⁹ tras la unión a las moléculas B7 de las CPA. Esta señal coestimuladora es necesaria, además de la unión del receptor de las células T a las moléculas MHC de clase I, para la respuesta de los linfocitos T.

TGF- β , por su parte, presenta también varias propiedades que le han otorgado un papel en la inducción de tolerancia: inhibe la producción de IL-2, y la subsecuente proliferación de las células T, inhibe también la señalización que permite la diferenciación de Th1 a Th2 e induce la expresión de Foxp3 y la generación de células

Treg²²⁰. El mecanismo por el cual TGF- β inhibe la función de las células T parece estar relacionado con la inhibición de las señales coestimuladoras TCR/CD3 y CD28/B7²²¹.

En nuestro estudio, hemos encontrado en los pacientes en tratamiento con ITE un aumento en la expresión de células Treg productoras de las citoquinas reguladoras IL-10 y TGF β , pero no en la de células nTreg. Al contrario que las células iTreg, las células nTreg suprimen a las células T efectoras mediante contacto celular. Los pocos estudios realizados en pacientes en tratamiento con ITE que utilizan el factor de transcripción Foxp3 como marcador de las células nTreg muestran datos dispares. Radulovic y cols.²²² encontraron un aumento significativo en el aumento de células TCD4+Foxp3+ durante la época de polinización de gramíneas en la mucosa nasal de pacientes alérgicos a polen de gramíneas dos años después de iniciar el tratamiento con ITE. Por el contrario, Möbs y cols.²²³ no detectaron cambios en el porcentaje de células TCD4+ Foxp3+ en pacientes alérgicos a polen de abedul tratados con ITE, al igual que el estudio de Lou y cols.²²⁴ realizado con niños con rinitis alérgica y en tratamiento con ITE para *Dermatophagoides pteronyssinus*. Estos resultados sugieren la posibilidad de que la ITE pueda inducir preferencialmente las células Treg Foxp3+ en los tejidos locales, pero no en sangre periférica.

III.3. CÉLULAS TCD4+ CTLA4+

CTLA-4, también conocido como CD152, se expresa tanto en células Treg como en células T CD4+ activadas. En las primeras, constituye uno de los mecanismos a través de los cuales dichas células podrían mediar sus funciones supresoras. La interacción de CTLA-4 con antígenos de la familia B7 (CD80 o CD86) de la superficie celular de las CDs bloquea la expresión de nuevas moléculas de CD80 y CD86²²⁵. Esta reducción en la expresión de CD80 y CD86 en las CDs limita la capacidad de éstas para estimular a las células T naive a través de CD28²²⁶, resultando en supresión de la respuesta inmune.

El CTLA-4 que se expresa en los linfocitos T activados se une a CD80 o CD86 de las CDs, como lo hace su homólogo CD28, pero a diferencia de éste, el CTLA-4 se comporta como regulador negativo de la activación celular²²⁷. Es decir, mientras que la unión de CD28 a las moléculas CD80 y CD86 conduce a activación y proliferación

clonal, la unión de las mismas moléculas al CTLA-4 de la superficie celular de los linfocitos T disminuye la activación celular.

Por tanto, en ambos casos (en células Treg y células TCD4+ activadas), el CTLA-4 tiene el mismo efecto: modula la respuesta inmune disminuyendo la activación de nuevas células efectoras. Uno de los objetivos del presente estudio fue evaluar si la ITE inducía la expresión de CTLA-4 en los pacientes tratados. Hasta la fecha, son muy pocos los estudios publicados que hayan evaluado el efecto de la ITE en la expresión de este antígeno. Piconi y cols.²²⁷ observan que el tratamiento con ITE estabiliza los valores de moléculas coestimuladoras en pacientes alérgicos al polen de abedul, de modo que se mantiene el balance entre CD28 y CTLA-4. Sin embargo no ofrecen los datos de significación estadística entre los sujetos vacunados y los no vacunados. En nuestro estudio no hemos observado diferencias en los niveles de expresión de CTLA-4 entre el grupo tratado con ITE y el que recibió tratamiento sintomático, lo que sugiere que el efecto beneficioso observado en los pacientes vacunados no está relacionado con la inducción de CTLA-4 en las células T. Esto también apoya la hipótesis de que la inmunoterapia induce la expresión de células Treg que actúan mediante liberación de citoquinas, y no mediante contacto celular.

III.4. CÉLULAS TCD4+CD154+

El CD154+ o CD40L es una molécula de superficie que se encuentra en los linfocitos T. Es el ligando de CD40, receptor localizado principalmente en linfocitos B y en las CPAs.

La interacción entre CD40 y CD40L es necesaria para la síntesis de moléculas de IgE por parte de las células B. Además, la unión CD40-CD40L constituye una señal coestimuladora fundamental para la correcta activación y proliferación de los linfocitos T naive²²⁶. La activación de estas células sin la coestimulación adecuada puede inducir un estado de hiporrespuesta a los alérgenos²²⁸.

Por ello, se cree que la reducción en la expresión de CD40L en los linfocitos T puede ser uno de los mecanismos a través de los cuales la inmunoterapia modula la

respuesta a los alérgenos. En nuestro estudio, los pacientes que recibieron tratamiento con ITE mostraron, a los seis meses de iniciar dicho tratamiento, niveles significativamente menores de CD40L, respecto a sus valores basales y respecto a los valores del grupo no tratado.

Parece que el bloqueo de la coestimulación CD40-CD40L no afecta a la activación de células Treg, sino que por el contrario, las convierte en las células funcionalmente dominantes, alterando el balance entre células T efectoras y células Treg en favor de éstas últimas ²²⁹, por lo que es muy probable que las células Treg estén implicadas en el descenso de la expresión del ligando del CD40 en los linfocitos T.

Estudios recientes apoyan esta hipótesis. Suzuki y cols. ²³⁰, han publicado que la inhibición de la expresión de CD40L resulta en una disminución en la producción de citoquinas Th2 y en un aumento del número de células Treg en ratones sensibilizados a ovoalbúmina. Del mismo modo, Taylor y cols. ²³¹ proponen que las células Treg intervienen activamente en la tolerancia a aloantígenos inducida *in vitro* por bloqueo de moléculas coestimuladoras con anticuerpos específicos. Por tanto, podría ser que las células Treg participen en la tolerancia a alérgenos mediante esta vía, bien inhibiendo directamente a las moléculas CD40L o bien proporcionando una ayuda indirecta pero esencial para tolerar las respuestas de las células T tras la disminución en la expresión de CD40L.

III.5. TEST DE ACTIVACIÓN DE BÁSÓFILOS

Los basófilos juegan un papel importante en la fase efectora de las enfermedades alérgicas mediante la liberación de mediadores como la histamina o de citoquinas Th2, como la IL-4 e IL-13.

Tras la unión del alérgeno al receptor FcεRI de la superficie celular de los basófilos, estos se activan, secretan mediadores y citoquinas y expresan rápidamente moléculas en la superficie celular. La citometría de flujo permite identificar estas moléculas *in vitro* mediante el uso de anticuerpos monoclonales. Hasta el momento, las moléculas más utilizadas son el CD63 y el CD203c ²³².

El test de activación de basófilos se ha utilizado en los últimos años en el diagnóstico de la alergia ²³³, pero no constituye una medida diagnóstica primaria, sino que es complementario a las determinaciones de IgE específica y a las pruebas cutáneas, particularmente cuando éstas no pueden llevarse a cabo o cuando la comparación entre sus resultados y la historia clínica arroja dudas. Está particularmente indicado en el diagnóstico de la alergia por veneno de insectos, alergia alimentaria, alergia al látex y alergias a medicamentos ²³⁴.

Nopp y cols. ²³⁵ han sugerido que el test de activación de basófilos puede ser también una herramienta importante para monitorizar las respuestas inmunes inducidas por la inmunoterapia. Algunos estudios realizados en pacientes alérgicos a venenos de insectos y en pacientes alérgicos a polen de abedul y cedro ²³⁶ muestran una disminución en la activación de basófilos en los pacientes en tratamiento, que se acompaña en la mayoría de los casos de una elevación de los anticuerpos IgG4 bloqueantes sin aumento de los niveles de IgE específica.

Nuestro estudio es el primero que evalúa el porcentaje de basófilos activados en pacientes alérgicos a olivo y/o polen tras el tratamiento con ITE. Comparados con sujetos sanos, los pacientes alérgicos presentan niveles significativamente menores de basófilos que expresan CD63 en la superficie celular. Por tanto, pensamos que la medida de la activación de basófilos también puede ser útil para monitorizar la eficacia de la ITE. Incluso, podría ser un buen marcador para tomar decisiones terapéuticas: en aquellos pacientes alérgicos en los que no se observe disminución en la activación de basófilos ni mejoría clínica creemos que estaría recomendado suspender el tratamiento con ITE.

IV.PARÁMETROS CLÍNICOS

Para valorar la eficacia de la ITE se utilizan normalmente parámetros clínicos como la medición de la función respiratoria, las pruebas cutáneas o los tests de provocación nasal y conjuntival. También se puede utilizar métodos menos invasivos, como los CRD o los cuestionarios de calidad de vida. Los CRD recogen la sintomatología, así como el tipo de medicación utilizado por cada paciente para contrarrestar los síntomas. Por su parte, los cuestionarios de calidad de vida, como el

mini-AQLQ o el mini-RQLQ, valoran los problemas que el asma y la rinitis, respectivamente, causan en la vida diaria de los pacientes. Sin embargo, estas determinaciones dependen de las concentraciones de pólenes y de la apreciación subjetiva que cada paciente tiene de sus síntomas y de la calidad de vida que lleva, lo que repercute también en el consumo de medicación.

En nuestro estudio, se valoró el efecto clínico de la inmunoterapia mediante las pruebas cutáneas, la cumplimentación de los CRD y el cuestionario mini-AQLQ (en los CRD se obtiene menor puntuación cuanto menor es la presencia de síntomas y el consumo de medicación. En el cuestionario de vida mini-AQLQ, por el contrario, una puntuación menor se corresponde con una mayor limitación debido a sintomatología alérgica). Al comparar los datos de los pacientes alérgicos tratados con ITE respecto a los no tratados, se pudo observar una clara tendencia hacia una mejoría clínica en el primer grupo (menor diámetro de pápula en las pruebas cutáneas, menor puntuación en los CRD y mayor puntuación en el mini-AQLQ). Sin embargo, esta tendencia no llegó a ser estadísticamente significativa en ninguno de los casos, probablemente debido a que los datos fueron recogidos durante la época de polinización del año 2011, en la que el recuento de pólenes gramíneas fue baja comparada con las concentraciones que normalmente se detectan en Ciudad Real. En España, y en concreto en Ciudad Real, el tipo de polen que más afecta a los pacientes alérgicos es el de gramíneas, por lo que las previsiones anuales de incidencia de reacciones alérgicas se basan en las concentraciones de éstas, que, además de ser el tipo de polen que mayor número de episodios causa a la población, es el más alergénico. Para su polinización, la gramínea requiere otoños muy lluviosos y climatología anticiclónica en el mes de mayo. En 2011, la concentración total alcanzó los 4.100 granos/m³, un 24 % menos de lo previsto por las lluvias del mes de mayo, convirtiéndose en una primavera moderada.

CONCLUSIONES

Con respecto al mapa de sensibilización de Ciudad Real:

- Los alérgenos Ole e 1, Phl p 5 y Phl p 1 se comportan como alérgenos mayores, mientras que los alérgenos Ole e 7 y Ole e 9 como menores. El número de pacientes en los que se detecta anticuerpos frente a los panalergenos estudiados es similar al encontrado en la bibliografía.
- En la población estudiada, es mayor el número de pacientes sensibilizados a los alérgenos del polen de gramíneas que a los alérgenos de olivo
- En nuestro caso, la determinación de IgE específica a varios panalergenos no pudo explicar la sensibilización a olivo y gramíneas observada en las pruebas cutáneas de algunos pacientes. No obstante, en el diagnóstico de polinosis es recomendable siempre evaluar los niveles de IgE específica frente alérgenos recombinantes, y no basar el diagnóstico sólo en el resultado de las pruebas cutáneas.

Tras la estimulación *in vitro* con alérgenos de olivo y gramíneas (Ole e1 y Phl p5) en los dos grupos de pacientes (grupo CNA: controles sanos y grupo P: pacientes alérgicos) se pudo concluir que:

- En los pacientes alérgicos se observa una mayor producción de IL4 (citoquina Th2) con respecto a los controles sanos. En contraste, no hay diferencias en la producción de IFN γ entre ambos grupos. Estos resultados indican un predominio de la respuesta Th2 en los pacientes alérgicos.
- Los porcentajes de células nTreg (utilizando como marcador la expresión de Foxp3) y de células iTreg que expresaban TGF- β eran significativamente mayores en el grupo de pacientes alérgicos. No hubo diferencias para la expresión de IL-10 entre ambos grupos.

Estos datos indican que las células T CD4+ de pacientes alérgicos tienen la habilidad de mostrar aspectos reguladores después de la estimulación *in vitro* con alérgenos específicos, pero *in vivo* la capacidad para suprimir la proliferación de las células T efectoras debe estar suprimida.

A los seis meses de iniciar el tratamiento con ITE, se detectó en los pacientes alérgicos que recibieron dicho tratamiento con respecto a los pacientes alérgicos del grupo control:

- Menor diámetro de pápula en los test cutáneos para gramíneas.
- Menor puntuación en los CRD.
- Mayor puntuación en el miniAQLQ, tanto en la valoración global como en la de cada uno de los ítems del cuestionario.

Es decir, nuestro estudio muestra una clara tendencia hacia la mejoría clínica. Sin embargo, esta tendencia no fue significativa, probablemente debido al periodo en el que se recogieron los datos, en el cual la cantidad de polen, sobretodo de gramíneas, fue muy baja comparada con las concentraciones normales de pólenes en el centro de España.

Después de recibir tratamiento con ITE, la estimulación in vitro con Ole e 1 y Phl p 5 mostró que la ITE:

- Induce en sangre periférica un cambio en la producción de citoquinas tipo Th2 hacia la producción de citoquinas Th1.
- Aumenta el número de células TCD4+ que producen citoquinas reguladoras TGF β e IL-10. Sin embargo, no aumenta la expresión de Foxp3 en estas células, lo que sugiere que el mecanismo de acción por el que la ITE inmunorregula las respuestas alérgicas es a través de la expresión de citoquinas.
- No modifica la expresión de CTLA-4 en células Tefectoras y células Treg. Esto último concuerda con que las células Treg de pacientes vacunados ejercen su función reguladora fundamentalmente mediante liberación de citoquinas y no mediante contacto celular.
- Disminuye significativamente el número de células T que expresan CD40L. Esta disminución implica un bloqueo en las señales coestimuladoras

necesarias para la activación de linfocitos T y para la liberación de moléculas de IgE. Muy probablemente, las células Treg estén implicadas en el descenso de la expresión del ligando del CD40 en los linfocitos T.

- Disminución en la activación de basófilos.

Estos parámetros inmunológicos que son modificados por el efecto beneficioso de la ITE podrían utilizarse para valorar la eficacia de la ITE de una forma más objetiva. De todos ellos, posiblemente el más útil por su baja complejidad analítica y por lo tanto por su coste, sea la disminución del ligando del CD40.

ANEXOS

ANEXO I. TABLAS RESULTADOS. VARIABLES INMUNOLÓGICAS.

GRUPOS CNA Y P

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
Foxp3	CNA	18	15,728	9,550	21,906	12,4239	11,900	1,7	44,0	42,3	13,8	0,002
	A	31	28,045	23,282	32,809	12,9863	27,300	3,5	58,1	54,6	15,1	
IL-4	CNA	18	9,772	7,255	12,290	5,0626	8,450	3,6	27,0	23,4	5,1	< 0,001
	A	31	25,229	20,554	29,904	12,7455	24,200	7,1	73,0	65,9	14,9	
IFN- γ	CNA	18	4,217	1,412	7,021	5,6391	2,450	,5	25,4	24,9	3,3	0,07
	A	31	7,923	5,943	9,902	5,3968	6,400	,1	22,6	22,5	9,1	
IL-10	CNA	18	4,067	1,455	6,678	5,2516	2,900	,0	23,6	23,6	4,2	0,885
	A	31	3,248	2,204	4,293	2,8478	2,500	,0	15,7	15,7		

GRUPOS A Y C

IL4-ANÁLISIS INTRAGRUPPO (GRUPO A)

	N	Media	IC del 95% para la media		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
			Límite inferior	Límite superior							
T1	19	27,03	20,02	34,04	25,30	14,55	7,1	73,0	65,9	15,6	.
T2	19	14,32	9,33	19,31	10,36	8,80	2,1	33,6	31,5		.
T2_T1	19	-12,71	-20,56	-4,87	16,28	-11,90	-49,70	8,30	58,00	25,60	0,005
T4	15	18,39	14,84	21,95	6,42	15,10	9,8	30,9	21,1	8,5	.
T4_T2	15	3,55	-2,34	9,43	10,62	6,50	-12,60	28,80	41,40	15,50	0,173
T4_T1	15	-7,55	-13,99	-1,10	11,64	-2,40	-27,90	14,80	42,70	16,70	0,019

IL4-ANÁLISIS INTRAGRUPPO (GRUPO C)

	N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
			Límite inferior	Límite superior							
T1	10	22,77	15,94	29,60	20,05	9,54	15,00	45,90	30,90	10,68	.
T2	10	26,00	19,22	32,77	9,47	25,65	10,00	43,90	33,90	13,58	.
T2_T1	10	3,23	-9,04	15,49	17,14	2,70	-35,90	27,50	63,40	19,36	0,333

IL4-ANÁLISIS INTERGRUPPO

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
T1	A	19	27,03	20,02	34,04	25,30	14,55	7,10	73,00	65,90	15,60	0,313
	C	10	26,00	19,22	32,77	9,47	25,65	10,00	43,90	33,90	13,58	
T2	A	19	14,32	9,33	19,31	10,36	8,80	2,10	33,60	31,50		0,012
	C	10	26,00	19,22	32,77	9,47	25,65	10,00	43,90	33,90	13,58	

IFN γ -ANÁLISIS INTRAGRUPU (GRUPO A)

	N	Media	IC del 95% para la media		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
			Límite inferior	Límite superior							
T1	19,00	6,71	4,29	9,12	5,60	5,01	0,10	22,60	22,50	5,10	.
T2	19,00	16,54	13,18	19,89	6,96	16,20	4,60	26,10	21,50	12,6	.
T2_T1	19,00	9,83	5,75	13,91	8,46	10,40	-7,10	23,10	30,20	15,10	0,001
T4	15,00	19,49	12,49	26,49	12,64	13,50	6,40	39,30	32,90	27,10	.
T4_T2	15,00	4,13	-2,63	10,88	12,19	2,10	-16,10	32,50	48,60	19,00	0,334
T4_T1	15,00	12,95	5,40	20,50	13,63	9,50	-1,10	39,10	40,20	26,90	0,001

IFN γ -ANÁLISIS INTRAGRUPU (GRUPO C)

	N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
			Límite inferior	Límite superior							
T1	10	9,70	5,38	14,02	10,30	6,04	,10	17,00	16,90	10,75	.
T2	10	6,99	5,39	8,59	2,23	7,45	3,20	10,40	7,20	3,23	.
T2_T1	10	-2,71	-6,87	1,45	5,81	-4,25	-10,20	5,80	16,00	10,48	,139

IFN γ -ANÁLISIS INTERGRUPO

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
T1	A	19	6,71	4,29	9,12	5,60	5,01	,10	22,60	22,50	5,10	0,183
	C	10	9,70	5,38	14,02	10,30	6,04	,10	17,00	16,90	10,75	
T2	A	19	16,54	13,18	19,89	6,96	16,20	4,60	26,10	21,50	12,6	< 0,001
	C	10	6,99	5,39	8,59	2,23	7,45	3,20	10,40	7,20	3,23	

Foxp3-ANÁLISIS INTRAGRUPU (GRUPO A)

	N	Media	IC del 95% para la media		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
			Límite inferior	Límite superior							
T1	19	33,09	27,79	38,40	11,00	31,80	16,10	58,10	42,00	16,70	.
T2	19	32,24	28,86	35,62	7,02	32,00	20,70	46,60	25,90	12,70	.
T2_T1	19	-0,85	-6,84	5,13	12,42	3,20	-23,60	21,10	44,70	17,40	0,952
T4	16	37,03	29,35	44,71	14,41	36,75	15,70	69,90	54,20	18,33	.
T4_T2	16	5,54	-3,08	14,16	16,18	4,45	-13,90	49,20	63,10	12,35	0,278
T4_T1	16	4,48	-5,73	14,69	19,16	8,90	-30,90	53,80	84,70	24,25	0'438

Foxp3-ANÁLISIS INTRAGRUPU (GRUPO C)

	N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
			Límite inferior	Límite superior							
T1	9	22,98	14,38	31,58	11,19	25,60	6,40	39,00	32,60	19,90	.
T2	9	27,08	22,15	32,00	6,41	26,40	16,50	36,50	20,00	10,35	.
T2_T1	9	4,10	-5,52	13,72	12,51	-0,60	-8,60	22,90	31,50	25,25	0,333

Foxp3-ANÁLISIS INTERGRUPO

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
T1	A	19	33,09	27,79	38,40	11,00	31,80	16,10	58,10	42,00	16,70	0,058
	C	9	22,98	14,38	31,58	11,19	25,60	6,40	39,00	32,60	19,90	
T2	A	19	32,24	28,86	35,62	7,02	32,00	20,70	46,60	25,90	12,70	0,104
	C	9	27,08	22,15	32,00	6,41	26,40	16,50	36,50	20,00	10,35	

IL10-ANÁLISIS INTRAGRUPRO (GRUPO A)

	N	Media	IC del 95% para la media		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
			Límite inferior	Límite superior							
T1	19	3,01	2,11	3,91	2,50	1,87	,00	7,00	7,00	2,70	.
T2	19	13,38	10,30	16,46	6,39	13,50	3,60	26,60	23,00	8,8	.
T2_T1	19	10,37	7,15	13,59	6,68	11,00	-3,00	22,40	25,40	8,70	< 0,001
T4	15	19,79	13,05	26,52	18,00	12,16	5,40	44,40	39,00	15,40	.
T4_T2	15	6,53	-,97	14,03	13,54	6,50	-12,10	33,00	45,10	18,50	0,158
T4_T1	15	17,19	10,27	24,11	12,49	13,90	1,20	42,10	40,90	16,70	0,001

IL10-ANÁLISIS INTRAGRUPRO (GRUPO C)

	N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
			Límite inferior	Límite superior							
T1	10	3,88	0,75	7,01	2,35	4,37	1,20	15,70	14,50	2,73	.
T2	10	4,07	1,39	6,75	3,74	3,60	0,80	13,30	12,50	3,95	.
T2_T1	10	0,19	-3,96	4,34	5,80	-0,44	-11,10	12,10	23,20	4,88	0,959

IL10-ANÁLISIS INTERGRUPRO

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
T1	A	19	3,01	2,11	3,91	2,50	1,87	,00	7,00	7,00	2,70	0,783
	C	10	3,88	,75	7,01	2,35	4,37	1,20	15,70	14,50	2,73	
T2	A	19	13,38	10,30	16,46	6,39	13,50	3,60	26,60	23,00	8,8	< 0,001
	C	10	4,07	1,39	6,75	3,74	3,60	,80	13,30	12,50	3,95	

TGFB-ANÁLISIS INTRAGRUPRO (GRUPO A)

	N	Media	IC del 95% para la media		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
			Límite inferior	Límite superior							
T1	19	8,00	6,29	9,71	8,00	3,55	2,20	15,00	12,80		.
T2	19	29,78	23,54	36,02	12,95	28,20	5,80	54,30	48,50		.
T2_T1	19	21,78	15,25	28,31	13,55	17,50	-3,40	49,00	52,40	22,30	< 0,001
T4	15	45,69	32,27	59,12	24,24	45,20	8,40	80,40	72,00	46,90	.
T4_T2	15	18,15	5,25	31,05	23,30	10,60	-10,60	57,20	67,80	30,70	0,008
T4_T1	15	37,60	23,24	51,96	25,93	36,60	-,90	73,50	74,40	51,20	0,002

TGFB-ANÁLISIS INTRAGRUPRO (GRUPO C)

	N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
			Límite inferior	Límite superior							
T1	10	10,69	6,13	15,25	7,70	6,37	3,20	23,50	20,30	8,98	.
T2	10	13,74	9,24	18,24	6,29	13,10	3,40	27,70	24,30	5,98	.
T2_T1	10	3,05	-4,48	10,58	10,53	4,85	-12,70	20,00	32,70	17,60	0,445

TGFB-ANÁLISIS INTERGRUPRO

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
T1	A	19	8,00	6,29	9,71	8,00	3,55	2,20	15,00	12,80		0,535
	C	10	10,69	6,13	15,25	7,70	6,37	3,20	23,50	20,30	8,98	
T2	A	19	29,78	23,54	36,02	12,95	28,20	5,80	54,30	48,50		0,001
	C	10	13,74	9,24	18,24	6,29	13,10	3,40	27,70	24,30	5,98	

CD152-ANÁLISIS INTRAGRUPU (GRUPO A)

	N	Media	IC del 95% para la media		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
			Límite inferior	Límite superior							
T1	19	14,90	7,80	22,00	12,83	11,50	1,90	46,90	45,00	7,60	.
T2	19	16,05	8,27	23,82	14,04	12,00	1,40	50,10	48,70	9,10	.
T2_T1	19	-1,11	-1,99	-,22	1,78	-1,25	-4,30	2,10	6,40	2,80	0,112
T4	16	16,43	9,71	23,14	12,12	12,10	3,40	43,80	40,40	17,10	.
T4_T2	16	-,53	-2,33	1,26	3,61	-,10	-9,20	4,10	13,30	4,85	0,717
T4_T1	16	-1,64	-3,70	,42	4,15	-1,15	-10,50	6,20	16,70	5,28	0,255

CD152-ANÁLISIS INTRAGRUPU (GRUPO C)

	N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
			Límite inferior	Límite superior							
T1	10	13,25	6,88	19,62	8,90	16,25	1,20	25,30	24,10	17,10	.
T2	10	13,57	6,75	20,39	9,54	15,35	1,60	27,20	25,60	18,45	.
T2_T1	10	-0,32	-1,56	0,92	1,73	0,00	-4,80	1,50	6,30	1,23	0,959

CD152-ANÁLISIS INTERGRUPO

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
T1	A	19	14,90	7,80	22,00	12,83	11,50	1,90	46,90	45,00	7,60	0,836
	C	10	13,25	6,88	19,62	8,90	16,25	1,20	25,30	24,10	17,10	
T2	A	19	16,05	8,27	23,82	14,04	12,00	1,40	50,10	48,70	9,10	0,801
	C	10	13,57	6,75	20,39	9,54	15,35	1,60	27,20	25,60	18,45	

CD154-ANÁLISIS INTRAGRUPU (GRUPO A)

	N	Media	IC del 95% para la media		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
			Límite inferior	Límite superior							
T1	19	3,43	2,67	4,19	1,37	3,10	1,00	6,20	5,20	2,30	.
T2	19	1,87	,84	2,89	1,85	1,50	,00	6,40	6,40	2,50	.
T2_T1	19	1,51	,67	2,34	1,67	1,20	-1,50	4,20	5,70	2,53	0,003
T4	16	1,04	,59	1,50	,82	,90	,14	2,50	2,36	1,58	.
T4_T2	16	-2,39	-3,27	-1,51	1,78	-2,15	-6,20	,10	6,30	2,90	,362
T4_T1	16	-,89	-1,90	,13	2,04	-,35	-6,26	2,00	8,26	2,07	,001

CD154-ANÁLISIS INTRAGRUPU (GRUPO C)

	N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
			Límite inferior	Límite superior							
T1	10	3,57	2,75	4,39	1,14	3,15	2,70	6,60	3,90	,83	.
T2	10	3,85	2,95	4,75	1,26	3,55	2,50	6,80	4,30	1,50	.
T2_T1	10	-,28	-,65	,09	,52	-,25	-1,60	,40	2,00	,20	0,123

CD154-ANÁLISIS INTERGRUPO

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
T1	A	19	3,43	2,67	4,19	1,37	3,10	1,00	6,20	5,20	2,30	0,646
	C	10	3,57	2,75	4,39	1,14	3,15	2,70	6,60	3,90	,83	
T2	A	19	1,87	,84	2,89	1,85	1,50	,00	6,40	6,40	2,50	<0,001
	C	10	3,85	2,95	4,75	1,26	3,55	2,50	6,80	4,30	1,50	

ACTIVACIÓN BASÓFILOS-ANÁLISIS INTRAGRUPU (GRUPO A)

	N	Media	IC del 95% para la media		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
			Límite inferior	Límite superior							
T1	15	,51	,42	,60	,16	,53	,23	,83	,60	,18	.
T2	19	,29	,19	,40	,19	,27	,07	,77	,70	,28	.
T2_T1	19	,18	,10	,26	,16	,15	,00	,49	,49	,25	0,001
T4	16	,37	,23	,51	,25	,29	,03	,93	,90	,25	.
T4_T2	16	-,10	-,25	,05	,31	-,18	-,61	,58	1,19	,43	0,116
T4_T1	15	,08	-,07	,24	,31	,03	-,35	,78	1,13	,41	0,485

ACTIVACIÓN BASÓFILOS-ANÁLISIS INTRAGRUPU (GRUPO C)

	N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
			Límite inferior	Límite superior							
T1	10	,63	,53	,73	,14	,63	,40	,88	,48	,16	.
T2	10	,69	,58	,81	,16	,69	,44	,95	,51	,24	.
T2_T1	10	-,06	-,13	,00	,09	-,05	-,23	,09	,32	,13	0,135

ACTIVACIÓN BASÓFILOS-ANÁLISIS INTERGRUPO

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
T1	A	19	,51	,42	,60	,16	,53	,23	,83	,60	,18	0,111
	C	10	,63	,53	,73	,14	,63	,40	,88	,48	,16	
T2	A	19	,29	,19	,40	,19	,27	,07	,77	,70	,28	<0,001
	C	10	,69	,58	,81	,16	,69	,44	,95	,51	,24	

ANEXO II. TABLAS RESULTADOS. DEMÓGRAFICOS Y VARIABLES CLÍNICAS.

GRUPOS CNA Y P

EDAD-ANÁLISIS INTERGRUPO

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
T0	CNA	18	34,28	29,96	38,59	8,68	34,07	16,53	48,34	31,82	11,01	0,190
	P	31	27,27	23,49	31,05	10,31	25,00	12,61	47,15	34,54	19,25	

GRUPOS A Y C

EDAD-ANÁLISIS INTERGRUPO

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
T0	A	19	26,11	21,28	30,95	10,03	23,78	12,61	45,61	33,00	19,25	0,414
	C	10	29,48	21,53	37,44	11,12	30,34	13,52	47,15	33,63	20,23	

TEST CUTÁNEOS GRAMÍNEAS-ANÁLISIS INTRAGRUPPO (GRUPO A)

	N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
			Límite inferior	Límite superior							
T0	19	7,23	5,37	9,10	3,09	7,00	3	13	10	6	.
T2	19	6,64	5,37	7,92	2,21	6,00	5	13	8	2	.
T2_T0	19	-1,38	-2,99	,22	2,66	-1,00	-6	4	10	3	0,210

TEST CUTÁNEOS GRAMÍNEAS-ANÁLISIS INTRAGRUPPO (GRUPO C)

	N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
			Límite inferior	Límite superior							
T0	10	6,63	4,53	8,72	2,50	6,00	4	12	8	3	.
T2	10	8,25	5,81	10,69	2,92	8,50	4	13	9	5	.
T2_T0	10	1,63	-,98	4,23	3,11	2,00	-3	5	8	6	0,149

TEST CUTÁNEOS GRAMÍNEAS T0-ANÁLISIS INTERGRUPO

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
T0	A	19	7,23	5,37	9,10	3,09	7,00	3	13	10	6	0,512
	C	10	6,63	4,53	8,72	2,50	6,00	4	12	8	3	

TEST CUTÁNEOS GRAMÍNEAS T2-ANÁLISIS INTERGRUPO

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
T2	A	19	6,64	5,37	7,92	2,21	6,00	5	13	8	2	0,166
	C	10	8,25	5,81	10,69	2,92	8,50	4	13	9	5	

TEST CUTÁNEOS OLIVO T0-ANÁLISIS INTERGRUPO

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
T0	A	19	6,20	4,94	7,46	2,27	6,000	2	11	9	3	0,843
	C	10	5,88	4,50	7,25	1,64	6,000	3	8	5	3	

CRD- ANÁLISIS INTERGRUPO

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
T2	A	19	73,53	56,45	90,62	30,85	86,00	15	105	90	52	0,503
	C	7	62,71	30,81	94,62	34,49	57,00	19	105	86	74	

MiniAQLQ Puntuación total- ANÁLISIS INTERGRUPO

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
T2	A	19	33,09	27,79	38,40	11,00	31,80	16,10	58,10	42,00	16,70	0,058
	C	9	22,98	14,38	31,58	11,19	25,60	6,40	39,00	32,60	19,90	

MiniAQLQ Síntomas- ANÁLISIS INTERGRUPO

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
T2	A	19	28,80	26,20	31,40	3,87	29,00	23,00	35,00	12,00	6,00	0,614
	C	9	22,33	9,16	35,50	12,55	24,00	7,00	35,00	28,00	25,00	

MiniAQLQ Función emocional- ANÁLISIS INTERGRUPO

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
T2	A	19	19,90	18,72	21,08	1,76	20,00	15,00	21,00	6,00	1,10	0,117
	C	9	12,67	4,36	20,97	7,92	12,50	4,00	21,00	17,00	16,25	

MiniAQLQ Estímulos ambientales- ANÁLISIS INTERGRUPO

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
T2	A	19	16,80	15,24	18,36	2,32	16,00	14,00	21,00	7,00	1,00	0,263
	C	9	13,17	5,50	20,83	7,31	14,50	3,00	21,00	18,00	15,00	

MiniAQLQ Limitación actividades- ANÁLISIS INTERGRUPO

		N	Media	IC para la media del 95%		Desv. Típ.	Mediana	Mín.	Máx.	Rango	IQR	Valor p
				Límite inferior	Límite superior							
T2	A	19	25,10	22,97	27,23	3,18	27,00	19,00	28,00	9,00	6,00	0,643
	C	9	21,33	12,76	29,90	8,16	23,00	8,00	28,00	20,00	12,50	

BIBLIOGRAFÍA

1. D'Amato G, Cecchi L, Bonini S, Nunes C, Annesi-Maesano I, Behrendt H, Liccardi G, Popov T, van Cauwenberge P. Allergic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy*, 2007; 62: 976-90.
2. Navarro Pulido, AM. Rinitis. En: *Alergológica 2005. Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España en 2005*. Madrid, Egraf, S.A.: 107-33.
3. Quince Gancedo, S. Asma. En: *Alergológica 2005. Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España en 2005*. Madrid, Egraf, S.A.: 133-161.
4. Feo Brito F, Galindo PA, Garcia R, Gomez E, Fernandez F, Fernandez-Pacheco R, Delicado A. Polenos alergenicos en Ciudad Real: Aerobiología e incidencia clinica. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin*, 1998; 13: 78-95.
5. Bostock J. On the Catarrhus aestivus or summer catarrhus. *Med Chir Trans London* 1828; 14:437.
6. Blackley, C. H.: *Experimental researches on the causes and nature of catarrhus aestivus (hay-fever or hay-Asthma)*. London, 1983. Faksimiledruck Dawson, London 1959.
7. Bagni N, Charpin H, Davies RR, Nolard N, Stix E. City spore concentrations in the European Economic Community (EEC) I. Grass pollen, 1973. *Clin Allergy*, 1976; 6: 61-68.
8. Subiza E, Subiza J, Jerez M. Aerobiología de las gramíneas en los climas de España. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 1989; 4: 45-50
9. Weeke ER, Spiekma FThM. Allergenic significance of Graminae (Poaceae). En: D'Amato, Spiekma FThM, Bonini S, eds. *Allergenic pollen and pollinosis in Europe*. London: Blackwell Scientific Publications; 1991. p. 109-12.
10. Subiza J, Jerez M, Subiza E. Introducción a la aerobiología de las gramíneas. *Rev Esp Alergol Inmunol Clín* 1992; 7: 151-61.
11. D'Amato G, De Palma R, Verga A, Martucci P, Liccardi G, Lobefalo G. Antigenic activity of nonpollen parts (leaves and stems) of allergenic plants (*Parietaria judaica* and *Dactylis glomerata*). *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1991;67:421-4.
12. Vinckier S, Smets E. The potential role of orbicules as vector of allergens. *Allergy*. 2001;56:1129-36.
13. Fernández-Caldas E, Bandele EO, Dunnette SL, Swanson MC, Reed CE. Rye grass group allergen content in leaves from seven different grass species. *Grana*. 1992;31:157-9.
14. Solomon WR. Airborne pollen: A brief life. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109:895-900.
15. Spiekma FThM, Kramps JA, van der Linden AC, Nikkels BH, Plomo A, Koerten HK, Dijkman JH. Evidence of grass-pollen allergenic activity in the smaller micronic atmospheric aerosol fraction. *Clin Exp Allergy*. 1990;20:273-80.
16. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N, in collaboration with the World Health Organization. Allergic rhinitis and its impact on Asthma (ARIA). *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108 part 2: 147S-333S.
17. *From the Global Strategy for Asthma Management and Prevention*, Global Initiative for

Asthma (GINA) 2011. Disponible en: <http://www.ginasthma.org/GINA>.

18. Alvarez MJ, Olaguibel JM, Lasa E, Arroabarren E, Gómez A, Gómez B. De la rinitis al asma: ¿una o dos enfermedades? *Anales de Navarra* 2003; 26 (2).

19. Serrano C, Valero A, Picado C. Rinitis y asma: una vía respiratoria, una enfermedad. *Arch Bronconeumol* 2005; 41 (10): 568-69.

20. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 5 (Suppl.): S147- S334.

21. Aberg, N.: Asthma and allergic rhinitis in Swedish conscripts. *Cl Exp Allergy* 1989; 19: 59-63.

22. Denis J.; Perdrizet, S.; Levallois, M.: Increased frequency of allergic diseases in Parisian students from 1968 to 1982. *Symposium International sur la prevention des maladies allergiques*. Florence. Italie. 1984.

23. Wuthrich, B.: In Switzerland pollinosis has really increased in the last decade. *ACI News* 1991; 3/2: 41-4.

24. *Alergologica* 1992. Factores epidemiológicos clínicos. y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España. Madrid: Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica y Alergia e Inmunología Abelló, 1995.

25. *Alergologica* 2005. Factores epidemiológicos clínicos. y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España en 2005. Madrid: Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica y Luzan 5, S.A. Ediciones, 2006.

26. Feo Brito, F.: Incidencia y características clínicas de las enfermedades alérgicas en Ciudad Real. En: *Sesiones Interhospitalarias Sociedad Madrid-Castilla La Mancha de Alergología e Inmunología Clínica*. Madrid. Luzán 5, S.A.1993: 399-411.

27. Feo F, Galindo PA, García R, Gómez E, Fernández F, Fernández-Pacheco R, Delicado A. Pólenes alérgicos en Ciudad Real: Aerobiología e incidencia Clínica. *Rev. Esp. Alergol Inmunol Clín*, 1998; 13 (2): 79-85.

28. Averbeck M, Gebhardt C, Emmrich F, Treudler R, Simon JC. Immunologic principles of allergic disease. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2007; 5:1015-1028.

29. Kay AB. Allergy and allergic diseases. *N Engl j Med* 2001; 344: 30-7.

30. Walker C, Bode E, Boer L, Hansel TT, Blaser K, Virchow JC Jr. Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:109-15.

31. Del Prete GF, De Carli M, D'Elios MM et al. Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders. *Eur J Immunol* 1993; 23:1445-9.

32. Robinson DS, Hamid Q, Ying S et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326:298-304.

33. Medoff BD, Sauty A, Tager AM et al. IFN-gamma-inducible protein 10 (CXCL10) contributes to airway hyperreactivity and airway inflammation in a mouse model of asthma. *J*

Immunol 2002; 168:5278–86.

34 Akbari O, Faul JL, Hoyte EG et al. CD4+ invariant T-cell receptor natural killer T cells in bronchial asthma. *N Engl J Med* 2006; 354:1117–29.

35 Vijayanand P, Seumois G, Pickard C et al. Invariant natural killer T cells in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2007; 356:1410–22.

36. Hashimoto T, Akiyama K, Kobayashi N, Mori A. Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 137 (Suppl. 1):51–4.

37. He R, Oyoshi MK, Jin H, Geha RS. Epicutaneous antigen exposure induces a Th17 response that drives airway inflammation after inhalation challenge. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:15817–22.

38. Molet S, Hamid Q, Davoine F et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:430–8.

39. Cottrez, F., Hurst, S. D., Coffman, R. L. and Groux, H., T regulatory cells inhibit a Th2-specific response in vivo. *J. Immunol.* 2000. 165: 4848–4853

40. Ling EM, Smith T, Nguyen XD et al. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004; 363:608–15

41. Grindebacke H, Wing K, Andersson AC, Suri-Payer E, Rak S, Rudin A. Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1364–72.

42. Abbas AK, Murphy K, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383:787–93.

43. Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH. Transcriptional regulation of Th1 /Th2 polarization. *Immunol Today* 2000; 21:479–83.

44. Oettgen HC, Geha RS. IgE in asthma and atopy: cellular and molecular connections. *J Clin Invest* 1999;104:829-35

45. Bacharier LB, Geha RS. Molecular mechanism of IgE regulation. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:S547-58

46. Romagnani S: Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 2006, 36:1357-1366.

47. Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A: CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* 2005, 6:152-162.

48. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY: A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005, 6:1142-1151.

49. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY: TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 2005, 201:1061-1067.

50. Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK, Tooley AJ, Ye J, Subudhi SK, Zheng XX, Strom TB,

Bluestone JA: Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2003, 171:3348-3352.

51. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299:1057–61.

52. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD41CD251 regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4:330–6.

53 Bennett CL, Christie J, Ramsdell F et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of Foxp3. *Nat Genet* 2001; 27:20–1.

54. Wu K, Bi Y, Sun K, Wang Ch. IL-10-Producing Type 1 Regulatory T Cells and Allergy. *Cellular & Molecular Immunology* 2007; 4: 269-273.

55. Vieira PL, Christensen J R, O'Garra A, et al. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2004;172:5986-5993.

56. Bachert C, Prohaska P, Pipkorn U. IgE-positive mast cells on the human nasal mucosal surface in response to allergen exposure. *Rhinology* 1990; 28: 149-58.

57. Chang TW, Davis FM, Sun N-C, Sun CRY, MacGlashan DW Jr, Hamilton RG. Monoclonal antibodies specific for human IgE-producing B cells: a potential therapeutic for IgE-mediated allergic diseases. *Biotechnology* 1990; 8: 122-6.

58. Lanzavecchia A, Sallusto F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 982–987.

59. Turner H, Kinet JP. Signaling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilon RI. *Nature* 1999;25:B24-30.

60. Grant JA, Huamin L. Biology of basophils. In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy: principles and practice*. 5th ed. St. Louis: Mosby-Year Book; 1998. p. 277-84.

61. Williams CM, Galli SJ. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:847-59.

62. Horwitz RJ, Busse WW. Inflammation and asthma. *Clin Chest Med* 1995; 16: 583-602.

63. Pearlman DS. Pathophysiology of the inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104 (4).

64. De Becker G, Moulin V, Tielemans F et al. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by soluble and membrane proteins provided by antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol*. 1998; 28: 3161–3171.

65. Lambrecht BN, De Veerman M, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Thielemans K, Pauwels RA. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J. Clin. Invest*. 2000; 106: 551–559.

66. Ranger AM, Das MP, Kuchroo VK, Glimcher LH. B7–2 (CD86) is essential for the development of IL-4-producing T cells. *Int. Immunol*. 1996; 8: 1549–1560.

67. Ohshima Y, Yang LP, Uchiyama T et al. OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naïve human CD4 (+) T cells into high IL-4-producing effectors. *Blood* 1998; 92: 3338–3345.
68. Aicher A, Hayden-Ledbetter M, Brady WA et al. Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J. Immunol.* 2000; 164: 4689–4696.
69. Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH et al. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* 2002; 8: 1024–1032.
70. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 133–146
71. Julia V, Hessel EM, Malherbe L, Glaichenhaus N, O’Garra A, Coffman RL. A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure. *Immunity* 2002; 16: 271–83.
- 72 Holt PG, Oliver J, McMenamin C, Schon-Hegrad MA. Studies on the surface phenotype and functions of dendritic cells in parenchymal lung tissue of the rat. *Immunology* 1992; 75: 582–7.
73. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194: 863–869.
74. Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T. and Sakaguchi, S., CTLA-4 control over Foxp3 regulatory T cell function. *Science* 2008; 322; 271–275.
75. Ethan M. Shevach. Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated suppression. *Immunity* 30, May 22, 2009
76. Gri, G., Piconese, S., Frossi, B., Manfroi, V., Merluzzi, S., Tripodo, C., Viola, A. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity* 2008. 29: 771–781.
77. Meiler, F., Klunker, S., Zimmermann, M., Akdis, C. A. and Akdis, M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 2008; 63; 1455–1463.
78. Meiler, F., Zumkehr, J., Klunker, S., Ruckert, B., Akdis, C. A. and Akdis, M. In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J. Exp. Med.* 2008. 205: 2887–2898.
79. Sakaguchi, S., Wing, K. and Yamaguchi, T., Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *Eur. J. Immunol.* 2009. 39: 2331–2336.
80. Bordignon V, Parmiani S. Reproducibility and use of low-concentration skin prick test. *J Invest All e rgol Clin Immunol* 2000; 10(2):78-82.
81. Demoly P, Michel FB, Bousquet J. In vivo methods for study of allergy skin tests, techniques, and interpretation. En Middleton E, Reed CE, Ellis EF et al. Editors. *Allergy: Principles and Practice*. 5a edición. St. Louis, Mosby. 1998: 432.
82. Paganelli R, Ansotegui I, Sastre J, Lange CE, Roovers MHW, de Groot H et al. Specific IgE antibodies in the diagnosis of atopic disease. Clinical evaluation of a new in vitro test

system in six European allergy clinics. *Allergy* 1998; 53: 763-768.

83. Eriksson NE. Allergy screening with Phadiatop and CAP Phadiatop in combination with a questionnaire in adults with asthma and rhinitis. *Allergy* 1990; 45: 285-292.

84. Sainte-Laudy J, sabbah A, Drouet M, Lauret MG, Loiri M. Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1166-1171

85. Sanz ML, Sánchez G, Vila L, Uasuf C, Chazot M, Diéguez I et al. Ag-induced basophil activation: CD63 cell expression detected by flow cytometry in patients allergic to Dermatophagoides pteronyssinus and Lolium perenne. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 1-8.

86. Saporta m, Kamei S, Persi L, Bousquet J, Arnoux B. Basophil activation during pollen season in patients monosensitized to grass pollens. *Allergy* 2001; 56: 442-445.

87. V. Plaza et al. GEMA (Guía española para el manejo del asma). *Arch Bronconeumol*. 2009;45(Supl 7):2-35.

88. Larché M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature Immunol*. 2006; 6: 761-771

89. Rolland J, O'Hehir R. Immunotherapy of allergy: anergy, deletion, and immune deviation. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:640-645.

90. Gardner LM, O'Hehir RE, Rolland JM. High dose allergen stimulation of T cells from house dust mite-allergic subjects induces expansion of IFN γ + T cells, apoptosis of CD4+IL-4+ T cells and T cell anergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 133:1-13.

91. Guerra F, Carracedo J, Solana-Lara R, Sanchez-Guijo P, Ramirez R. TH2 lymphocytes from atopic patients treated with immunotherapy undergo rapid apoptosis after culture with specific allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:647-53.

92. Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden C, Muller UR. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN- γ secretion in specific allergen stimulated T cell cultures. *J Immunol* 1995; 154:4187-94.

93. Francis JN, Till SJ, Durham SR. Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:1255-61.

94. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998; 102:98-106.

95. Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 1993; 150:353-60.

96. McKinstry KK, Strutt TM, Buck A *et al*. IL-10 deficiency unleashes an influenza-specific Th17 response and enhances survival against high-dose challenge. *J Immunol* 2009; 182:7353-63.

97. Ying S, Humbert M, Meng Q *et al*. Local expression of epsilon germline gene transcripts and RNA for the epsilon heavy chain of IgE in the bronchial mucosa in atopic and nonatopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:686-92.

98. James LK, Durham SR. Update on mechanisms of allergen injection immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2008; 1074–88.
99. Akdis CA, Akdis M, Blesken T, Wymann D, Alkan SS, Muller U et al. Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. *J Clin Invest* 1996; 98:1676–1683.
100. Muller UR, Helbling A, Bischof M. Predictive value of venom-specific IgE, IgG and IgG subclass antibodies in patients on immunotherapy with honey bee venom. *Allergy* 1989; 44:412–418.
101. Van der Giessen M, Homan WL, van Kernbeek G, Aalberse RC, Dieges PH. Subclass typing of IgG antibodies formed by grass pollen-allergic patients during immunotherapy. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1976;50:625–640.
102. Jutel M, Jaeger L, Suck R, Meyer H, Fiebig H, Cromwell O. Allergen-specific Immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116: 608–613.
103. Reisinger J, Horak F, Pauli G, van Hage M, Cromwell O, Konig F et al. Allergen-specific nasal IgG antibodies induced by vaccination with genetically modified allergens are associated with reduced nasal allergen sensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:347–354.
104. Mothes, N. *et al.* Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. *Clin. Exp. Allergy* 33, 1198–1208 (2003)
105. Visco, V. *et al.* Human IgG monoclonal antibodies that modulate the binding of specific IgE to birch pollen Bet v 1. *J. Immunol.* 157, 956–962 (1996).
106. Jeannin, P., Lecoanet, S., Delneste, Y., Gauchat, J. F. & Bonnefoy, J. Y. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J. Immunol* 160, 3555–3561 (1998).
107. Briere, F., Servet-Delprat, C., Bridon, J. M., Saint-Remy, J. M. & Banchereau, J. Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (sIgD+) B cells to secrete IgG1 and IgG3. *J. Exp. Med.* 179, 757–762 (1994).
108. Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 2008; 63: 1455–1463.
109. Shim YK, Kim BS, Cho SH, Min KU, Hong SJ. Allergen-specific conventional immunotherapy decreases immunoglobulin E-mediated basophil histamine releasability. *Clin Exp Allergy* 2003;33:52–57.
110. Pierkes M, Bellinghausen I, Hultsch T, Metz G, Knop J, Saloga J. Decreased release of histamine and sulfidoleukotrienes by human peripheral blood leukocytes after wasp venom immunotherapy is partially due to induction of IL-10 and IFN-gamma production of T cells. *J Allergy Clin Immunol* 1999;1:326–332.
111. Schandane L, Alonso-Vega C, Willems F, Gerard C, Delvaux A, Velu T et al. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J Immunol* 1994;152:4368–4374.
112. Wilson DR, Lima MT, Durham SR. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis:

systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2005; 60:4–12.

113. Radulovic C, Calderon M, Wilson S, Durham SR. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: an updated Cochrane systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2007; 62 (s83):167–71.

114. Calamita Z, Saconato H, Pela AB, Atallah AN. Efficacy of sublingual immunotherapy in asthma: systematic review of randomized clinical trials using the Cochrane Collaboration Method. *Allergy* 2006; 61:1162–72.

115. Penagos M, Passalacqua G, Campalati E *et al.* Meta-analysis of the efficacy of sublingual immunotherapy in the treatment of allergic asthma in pediatric patients, 3–18 years of age. *Chest* 2008; 133:599–609.

116. Canonica GW, Passalacqua G. Noninjection routes for immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:437–48.

117. Bousquet J, Van Cauwenberge P, eds. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:S240–5.

118. Nieto A, Mazon A, Pamies R, Bruno L, Navarro M, Montanes A. Sublingual immunotherapy for allergic respiratory diseases: an evaluation of meta-analyses. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:157–61.

119. Dolz I, Martinez-Cocera C, Bartolome JM, Cimarra M. A double-blind, placebo-controlled study of immunotherapy with grass pollen extract Alutard SQ during a 3-year period with initial rush immunotherapy. *Allergy* 1996; 51(7): 489-500.

120. Ortolani C, Pastorello E, Moss RB, Hsu Yp, Restuccia M, Joppolo G *et al.* Grass pollen immunotherapy: a single year double-blind, placebo-controlled study in patients with grass pollen-induced asthma and rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73(2):283-290.

121. Zenner Hp, Baumgarten C, Rasp G, Fuchs T, Kunkel G, Hauswald B *et al.* Short-term immunotherapy: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study of molecular standardized grass and rye allergens in patients with grass pollen induced allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100(1): 23-29.

122. Meriney DK, Kothari H, Chinoy P, Grieco MH. The clinical and immunologic efficacy of immunotherapy with modified ragweed extract (allergoid) for ragweed hay fever. *Ann Allergy* 1986; 56(1): 34-38.

123. Norman PS, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, Marsh DG. Controlled evaluation of allergoid in the immunotherapy of ragweed hay fever. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 70(4): 248-260.

124. Andre C, Perrin-Fayolle M, Grosclaude M, Couturier P, Basset D, Cornillon J *et al.* A double-blind placebo-controlled evaluation of sublingual immunotherapy with a standardized ragweed extract in patients with seasonal rhinitis. Evidence for a dose-response relationship. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 131(2): 111-118.

125. D'Amato G, Kordash TR, Liccardi G, Lobefalo G, Cazzola M, Freshwater IL. Immunotherapy with Alpare in patients with respiratory allergy to *Parietaria* pollen: a two year double-blind placebo-controlled study. *Clin Exp Allergy* 1995; 25(2): 149-158.

126. Ortolani C, Pastorello EA, Incorvaia C, Ispano M, Farioli L, Zara C *et al.* A double-blind,

placebo-controlled study of immunotherapy with an alginate-conjugated extract of *Parietaria judaica* in patients with *Parietaria* hay fever. *Allergy* 1994; 49(1): 13-21.

127. Bodtger U, Poulsen LK, Jacobi HH, Malling HJ. The safety and efficacy of subcutaneous birch pollen immunotherapy -a one-year, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Allergy* 2002; 57(4): 297-305.

128. Guerra F, Daza JC, Almeda E. Immunotherapy with a depigmented, polymerized vaccine of *Olea europaea* pollen allergens. Significantly reduces specific bronchial and skin test reactivity in sensitized patients after one year of treatment. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2003; 13(2): 108-117.

129. Ross R, Nelson H, Finegold I. Effectiveness of Specific Immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis: an analysis of randomized, prospective single or double-blind, placebo-controlled studies. *Clin Ther* 2000; 22: 342-350.

130. Abramson M, Puy R, Weiner J. Is allergen immunotherapy effective in asthma? A meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 969-974.

131. Abramson M, Puy R, Weiner J. Immunotherapy in asthma: an updated systematic review. *Allergy* 1999; 54: 1022-1041

132. Ross R, Nelson H, Finegold I. Effectiveness of Specific Immunotherapy in the treatment of asthma: a meta-analysis of prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled studies. *Clin Ther* 2000; 22: 329-341.

133. Abramson M, Puy R, Weiner J. Allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; (4): CD001186.

134. Durham SR, Walker SM, Varga EM, Jacobson MR, O'brien F, Noble W et al. Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med* 1999; 341(7): 468-475.

135. Eng PA, Reinhold M, Gnehm HP. Long-term efficacy of preseasonal grass pollen immunotherapy in children. *Allergy* 2002; 57(4):306-312.

136. Des RA, Paradis L, Menardo JL, Bouges S, Daures JP, Bousquet J. Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99(4): 450-453.

137. Pajno GB, Barberio G, De Luca F, Morabito L, Parmiani S. Prevention of new sensitizations in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy. A six-year follow-up study. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(9): 1392-1397.

138. Grembiale RD, Camporota L, Naty S et al. Effects of specific immunotherapy in allergic rhinitis individuals with bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2048-2052.

139. Robredo T, Cimarra M, Martínez Cócera C, Bartolomé JM. Inmunoterapia: seguimiento post-retirada. *Rev Esp Alergol Inmunol Clín* 1998; 13 (ext 2): 55-57.

140. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102(4 Pt 1): 558-562.

141. Rodríguez R, Villalba M, Monsalve RI, Batanero E. Alérgenos: del estudio molecular a la clínica. *Alergol Inmunol Clín* 2000; 15 (Extraordinario Núm. 2):114-134.

142. Rodríguez, R. Los alérgenos recombinantes en el laboratorio. *Allergo et Immunopathol.* 2010; 38 (Espec Cong):6-8
143. Nelson HS, Solomon WR. How ill the wind? Issues in aeroallergen sampling. *Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 3-8.
144. Cabrera M, Martínez-Cocera C, Fernández-Caldas E, Carnés Sánchez J, Boluda L, Tejada J, Subiza JL, Subiza J, Jerez M. *Trisetum paniceum* (wild oats) pollen counts and aeroallergens in the ambient air of Madrid, Spain. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128: 123-9.
145. Grote M, Vrtala S, Niederberger V et al. Release of allergen-bearing cytoplasm from hydrated pollen: A mechanism common to a variety of grass (Poaceae) species revealed by electron microscopy *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:109-15.
146. Busse WW, Reed CE, Hoehne JH. Where is the allergic reaction in ragweed asthma? *J Allergy Clin Immunol* 1972; S0: 289-93.
147. Dolovich J, Zimmerman B, Hargreave FE. Allergy in asthma. En: Clark TJH, Godfrey S, eds. *Asthma*. London: Chapman & Hall; 1983. p. 132-57.
148. Moreno-Aguilar C. Improving pollen immunotherapy: minor allergens and panallergens *Allergol Immunopathol* 2008;36(1):26-30.
149. Subiza J, Masiello JM, Subiza JL et al. Prediction of annual variation in atmospheric concentrations of grass pollen. A method based on meteorological factors and grain crop estimates. *Clin Exp Allergy* 1991; 22: 540-546.
150. Font Tullot I. *Climatología de España y Portugal*. Madrid: Instituto Nacional de Meteorología; 1983.
151. King TP, Hoffman, Lowenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TAE, Thomas WR. Allergen Nomenclature. *Bull World Health Organ* 1994;72:797-80.
152. King TP, Hoffman D, Lowenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TAE, Thomas WR. Allergen nomenclature. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1994;105:224-33
153. Subiza J, Feo Brito F, Pola J, Moral A, Fernández J, Jerez M, Ferreira M. Pólenes alérgicos y polinosis en 12 ciudades españolas. *Rev Esp Alergol Inmunol Clín* 1998; 13: 45-58.
154. Weber RW. Cross-reactivity among pollens. *Ann Allergy* 1981; 46: 208-15.
155. Bush RK. Aerobiology of pollen and fungal allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 1120-4.
156. Andersson K, Lidholm J. Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 130: 87-107
157. Suphioglu C. What are the important allergens in grass pollen that are linked to human allergic disease? *Clin Exp Allergy* 2000; 30:1335-1341.
158. Macchia L. Allergenic significance of Oleaceae pollen. In: D'Amato G, Spiekma F. Th. M, Bonini S. eds. *Allergenic pollen and pollinosis in Europe*. London: Blackwell Scientific Publications, 1991:87-93.

159. Quiralte J, Palacios L, Rodríguez R, Cárđaba B, Arias de Saavedra JM, Villalba M, Florido JF, Lahoz C. Modelling Diseases: The Allergens of *Olea europaea* Pollen. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007; Vol. 17, Supplement 1: 76-82
160. Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 821-30.
161. Egger M, Mutschlechner S, Wopfner N, Gadermaier G, Briza P, Ferreira F. Pollen-food syndromes associated with weed pollinosis: an update from the molecular point of view. *Allergy*. 2006; 61(4):461-76.
162. Rodríguez R, Villalba M, Batanero E, Palomares O, Quiralte J, Salamanca G, Sirvent S, Castro L, Prado N. Olive Pollen Recombinant Allergens: Value in Diagnosis and Immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007; Vol. 17, Supplement 1: 56-62.
163. Orovitg A, Guardia P, Barber D, de la Torre F, Rodríguez R, Villalba M, Salcedo G, Monteseirín J, Conde J. Enhanced Diagnosis of Pollen Allergy Using Specific Immunoglobulin E Determination to Detect Major Allergens and Panallergens. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011; Vol. 21(4): 253-259.
164. Kaul S, Englert L, May S, Vieths S. Regulatory aspects of specific immunotherapy in Europe. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010 (10):594–602.
165. Barber D, Moreno C, Ledesma A, Serrano P, Galán A, Villalba M, Guerra F, Lombardero M, Rodríguez R. Degree of Olive Pollen Exposure and Sensitization Patterns. Clinical Implications. *Investig Allergol Clin Immunol* 2007; Vol. 17, Supplement 1: 63-68
166. Barber D, De la Torre F, Feo F, Florido F, Guardia P, Moreno C, Quiralte J, Lombardero M, Villalba M, Salcedo G, Rodríguez R. Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study *Allergy* 2008; 63: 1550–1558.
167. Rodríguez R, Villalba M, Monsalve RI, Batanero E. The spectrum of olive pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125: 185-195.
168. Serrano P. Sensibilización a alérgenos minoritarios de *Olea europaea* como causa de reacciones sistémicas por inmunoterapia alérgeno-específica. Doctoral Thesis, Córdoba: Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, 2007.
169. Mari A. Multiple pollen sensitization: a molecular approach to the diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;125:57-65
170. van Ree R, Fernández-Rivas M, Cuevas M, van Wijngaarden M, Aalberse RC. Pollen-related allergy to peach and apple: an important role for profilin. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;95:726-34.
171. Salcedo G, Sánchez-Monge R, Barber D, Díaz-Perales A. Plant non-specific lipid transfer proteins: An interface between plant defence and human allergy. *Biochem Biophys Acta* 2007;1771:781-91.
172. Scheurer S, Lauer I, Foetisch K, San Miguel-Moncín MM, Retzek M, Hartz C, Enrique E, Lidholm J, Cisteró-Bahima A, Vieths S. Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:900-7.
173. Fernández-Rivas M, González-Mancebo E, Rodríguez-Pérez R, Benito C, Sánchez-Monge

R, Salcedo G, Alonso MD, Rosado A, Tejedor MA, Vila C, Casas ML. Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112:789-95

174. Asero R, Jimeno L, Barber D. Preliminary results of a skin prick test-based study of the prevalence and clinical impact of hypersensitivity to pollen panallergens (polcalcin and profilin). *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010, Vol 20 (1):35-38.

175. Robinson D, Hamid Q, Bentley A, et al. Activation of CD4₊T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92:313–324.

176. Wierenga EA, Snoek M, de Groot C, et al. Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD2₊T lymphocytes in atopic patients. *J Immunol* 1990; 144:4651–4656.

177. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, et al. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 2004; 199:1567–1575.

178. Akdis M. Immune tolerance in allergy. *Curr Opin Immunol* 2009, 21:700–707.

179. Imada M, Simons FE, Jay FT, Hayglass KT. Allergen-stimulated interleukin-4 and interferon-gamma production in primary culture: responses of subjects with allergic rhinitis and normal controls. *Immunology* 1995; 85: 373-80.

180. Van Overtvelt L, Wambre E, Maillère B, von Hofe E et al. Assessment of Bet v 1-specific CD4⁺T cell responses in allergic and nonallergic individuals using MHC class II peptide tetramers. *J Immunol* 2008; 180:4514-22.

181. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345–52.

182. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299 (2003) 1057-1061.

183. Xu G, Mou Z, Jiang H, Cheng L, Shi J, Xu R, Oh Y, Li H. A possible role of CD4⁺CD25⁺T cells as well as transcription factor Foxp3 in the dysregulation of allergic rhinitis. *Laryngoscope*. 2007 May;117(5):876-80.

184. Han D, Wang C, Lou W, Gu Y, Wang Y, Zhang L. Allergen-specific IL-10-secreting type I T regulatory cells, but not CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells, are decreased in peripheral blood of patients with persistent allergic rhinitis. *Clin Immunol*. 2010 Aug;136(2):292-301. doi: 10.1016/j.clim.2010.03.006. Epub 2010 Apr 18

185. Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszczyk M, Blaser K, Akdis CA: IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1205–1214.

186. Thunberg S, Akdis M, Akdis CA, Gronneberg R, Malmstrom V, Trollmo C, van Hage M, Gafvelin G: Immune regulation by CD4⁺ + CD25⁺ + T cells and interleukin10 in birch pollen-allergic patients and non-allergic controls. *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 1127–1136.

187. Francis JN, Till SJ, Durham SR: Induction of IL-10 + CD4⁺ + CD25⁺ + T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 1255–1261.

188. Domdey A, Liu A, Millner A, Lund K, Jacobi H, Malling HJ, Søndergaard I, Würtzen

PA. The T Cell Response to Major Grass Allergens Is Regulated and Includes IL-10 Production in Atopic but Not in Non-Atopic Subjects. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;152:243–254.

189. Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, Carr VA, Robinson DS. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004;363: 608-15.

190. Möbs, C., C. Slotosch, H. Löffler, W. Pfutzner, and M. Hertl. 2008. Cellular and humoral mechanisms of immune tolerance in immediate-type allergy induced by specific immunotherapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 147: 171–178.

191. Walker SM, Varney VA, Gaga M, Jacobson MR, Durham SR. Grass pollen immunotherapy: efficacy and safety during a 4-year follow-up study. *Allergy* 1995 50: 405–413.

192. Bødtger, U, Poulsen LK, Jacobi HH, Malling HJ. The safety and efficacy of subcutaneous birch pollen immunotherapy - a one-year, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Allergy* 2002; 57: 297–305.

193. Grammer, LC., Zeiss CR., Suszko IM, Shaughnessy MA, Patterson R. A double-blind, placebo-controlled trial of polymerized whole ragweed for immunotherapy of ragweed allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 69: 494–499.

194. Jutel, M., L. Jaeger, R. Suck, H. Meyer, H. Fiebig, and O. Cromwell. 2005. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol* 1998. 116: 608–613

195. Bousquet, J., Lockett R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *AWHO position paper. J. Allergy Clin. Immunol* 1998. 102: 558–562.

196. Purello-D'Ambrosio F, Gangemi S, Merendino RA, Isola S, Puccinelli P, Parmiani S, Ricciardi L. Prevention of new sensitizations in monosensitized subjects submitted to specific immunotherapy or not. A retrospective study. *Clin. Exp. Allergy* 31: 1295–1302.

197. Demoly, P, Bousquet J, Michel FB. Immunotherapy in allergic rhinitis: a prevention for asthma? *Curr. Probl. Dermatol.* 1999 28: 119–123.

198. Möller C, Dreborg S, Ferdousi HA, Halken S, Høst A, Jacobsen L, Koivikko A, Koller DY, Niggemann B, Norberg, LA. Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study). *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 1109: 251–256.

199. Maggi E, Vultaggio A, Matucci A. T-cell responses during allergen-specific immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012, 12:1–6

200. Wachholz PA, Nouri-Aria KT, Wilson DR, Walker SM, Verhoef A, Till SJ, Durham SR. Grass pollen immunotherapy for hayfever is associated with increases in local nasal but not peripheral Th1:Th2 cytokine ratios. *Immunology.* 2002 Jan;105(1):56-62.

201. Durham SR, Ying S, Varney VA, Jacobson MR, Sudderick RM, Mackay IS, Kay AB, Hamid QA. Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon-gamma. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;97:1356–65.

202. Klimek L, Dormann D, Jarman ER, Cromwell O, Riechelmann H, Reske-Kunz AB. Short-term preseasonal birch pollen allergoid immunotherapy influences symptoms, specific nasal

provocation and cytokine levels in nasal secretions, but not peripheral T-cell responses, in patients with allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 1999;29:1326–35

203. Hamid Q, Schotman E, Jacobson M, Walker S, Durham S. Increases in IL-12 messenger RNA+ cells accompany inhibition of allergen-induced late skin responses after successful grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Feb;99(2):254-60.

204. Hsieh C-S, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4 + T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993;260:547-9.

205. Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni M-P, Maggi E, Trinchieri G, et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin-12 {IL-12}) induces T helper type 1 (Th-1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4 producing Th cells. *J Exp Med* 1993;177:1199-204.

206. Kiniwa M, Gately M, Gubler U, Fargeas C, Delespesse GJ. Recombinant interleukin-12 suppresses the synthesis of immunoglobulin E by interleukin-4 stimulated human lymphocytes. *J Clin Invest* 1992;90: 262-6.

207. O'Hehir RE, Yssel H, Verma S, et al. Clonal analysis of differential lymphokine production in peptide and superantigen induced T-cell allergy. *Int Immunol* 1991;3:819-26.

208. Francis J, Till S, Durham S. Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Jun;111(6):1255-61.

209. Moverare R, Elfman L, Bjornsson E, Stoalenheim G. Cytokine production by peripheral blood mononuclear cells following birch-pollen immunotherapy. *Immunol Lett*. 2000;73:51–6.

210. Till S, Walker S, Dickason R, Huston D, O'Brien F, Lamb J, et al. IL-5 production by allergen-stimulated T cells following grass pollen immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Immunol* 1997;110:114-21.

211. Ebner C, Siemann U, Bohle B, et al. Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl, p. 1, a major grass pollen allergen. *Clin Exp Allergy*. 1997;27:1007–15.

212. Benjaponpitak S, Oro A, Maguire P, Marinkovich V, DeKruyff RH, Umetsu DT. The kinetics of change in cytokine production by CD4 T cells during conventional allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103:468–75.

213. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 2009 May;30(5):636-45. doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.010.

214. Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol* 1998;160:3555-61.

215. Royer B, Varadaradjalou S, Saas P, Guillosson JJ, Kantelip JP, Arock M. Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clin Exp Allergy* 2001;31:694-704.

216. Takanashi S, Nonaka R, Xing Z, O'Byrne P, Dolovich J, Jordana M. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *J Exp Med* 1994;180:711-5.

217. Schandene L, Alonso-Vega C, Willems F, Gerard C, Delvaux A, Velu T, et al. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J Immunol* 1994;152:4368-74.
218. Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996;184:19-29.
219. Akdis CA, Joss A, Akdis M, Faith A, Blaser K. A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding. *FASEB J* 2000;14:1666-8.
220. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006;24:99-146.
221. Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszc M, Blaser K, Akdis CA. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol*. 2003 May;33(5):1205-14
222. Radulovic S, Jacobson MR, Durham SR, Nouri-Aria KT. Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+ CD25+ cells in the nasal mucosa *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Jun; 121(6):1467-72.
223. Möbs C, Slotoch C, Löffler H, Jakob T, Hertl M, Pfützner W. Birch pollen immunotherapy leads to differential induction of regulatory T cells and delayed helper T cell immune deviation. *J Immunol*. 2010 Feb 15; 184(4):2194-203.
224. Lou W, Wang C, Wang Y, Han D. and Zhang, L. Responses of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and IL-10-secreting type I T regulatory cells to cluster-specific immunotherapy for allergic rhinitis in children. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2012, 23: 141-150.
225. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*. 2011 Apr 29;332(6029):600-3.
226. Bugeon, L, Dallman LJ. Costimulation of T cell responses. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2000; 62: 164-168.
227. Piconi S, Trabattoni D, Saresella M, Iemoli E, Schenal M, Fusi A et al. Effects of specific immunotherapy on the B7 family of costimulatory molecules in allergic inflammation. *J Immunol*. 2007 Feb 1;178(3):1931-7
228. Appelman, LJ, Tzachanis D, Grader-Beck T, Van Puijenbroek AA, Boussiotis VA. Induction of immunological tolerance for allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Leuk. Lymphoma* 2002. 43: 1159-1167.
229. Vogel I, Verbinnen B, Maes W, Boon L, Van Gool S, Ceuppens JL. Foxp3+ regulatory T cells are activated in spite of B7-CD28 and CD40-CD40L blockade. *Eur. J. Immunol*. 2013. 43: 1013-1023
230. Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. Cd4⁺Cd25⁺ Immune Regulatory Cells Are Required for Induction of Tolerance to Alloantigen via Costimulatory Blockade. 2001. 193 (11): 1311-1318

231. Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4+CD25+ immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med.* 2001 June 4; 193(11): 1311–1318.
232. DG Ebo, CH Bridts, Hagendorens MM, Aerts NE, De Clerck LS, Stevens WJ. Basophil Activation Test by Flow Cytometry: Present and Future Applications in Allergology. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 74B:201–210 (2008)
q 2008
233. Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bienvenu J, Blanca M, Demoly P, Ebo DG, Mayorga L, Monneret G, Sainte-Laudy J. Diagnostic Tests Based on Human basophils: More Potentials and Perspectives than Pitfalls. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;146:177–189.
234. Czarnobilska E, Gregorius A, Porebski G, Spiewak R, Sacha M. The benefits of using basophil activation test as a diagnostic tool prior to specific immunotherapy with inhalant allergens. *Przegl Lek.* 2012;69(12):1249-53.
235. Nopp A, Cardell LO, Johansson SG, Oman H. CD-sens: a biological measure of immunological changes stimulated by ASIT. *Allergy* 2009; 64:811–4
236. Lalek N, Kosnik M, Silar M, Korosec P. Immunoglobulin G-dependent changes in basophil allergen threshold sensitivity during birch pollen immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2010; 40: 1186–93.