

Departamento de Microbiología y Genética



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Tesis Doctoral

**RESPUESTA CLÍNICA E INMUNOLÓGICA
EN PACIENTES CON RINOCONJUNTIVITIS ALÉRGICA
TRATADOS CON INMUNOTERAPIA SUBLINGUAL**

Gloria Inés Hincapié López

Directores

Dr. D. Ignacio Dávila González

Dr. D. Felix Lorente Toledano

Dra. Dña. Maria Isidoro García

Dra. Dña. Catalina Sanz Lozano

2017



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Departamento de Microbiología y Genética

**RESPUESTA CLÍNICA E INMUNOLÓGICA
EN PACIENTES CON RINOCONJUNTIVITIS ALÉRGICA
TRATADOS CON INMUNOTERAPIA SUBLINGUAL**

Memoria presentada por Dña. Gloria Inés Hincapié López para optar al grado de Doctora

Fdo: Gloria Inés Hincapié López

2017

El Prof. Dr. D. Félix Lorente Toledano, la Prof^a. Dra. Doña. María Isidoro García, el Prof. Dr. D. Ignacio J. Dávila González y la Prof^a. Dra. Doña Catalina Sanz Lozano.

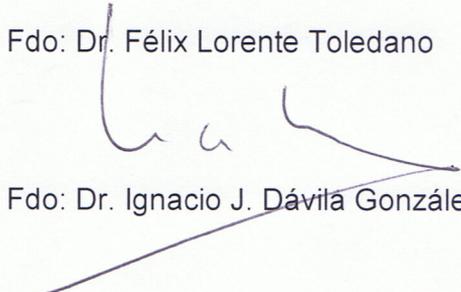
CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado "Respuesta clínica e inmunológica en pacientes con rinoconjuntivitis alérgica tratados con inmunoterapia sublingual.", que presenta la Licenciada en Médica y Cirugía Doña Gloria Inés Hincapié López ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética Molecular y reúne, a nuestro juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el Tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Salamanca a 10 de Julio de 2017.



Fdo: Dr. Félix Lorente Toledano



Fdo: Dr. Ignacio J. Dávila González



Fdo: Dra. María Isidoro García.



Fdo: Dra. Catalina Sanz Lozano.

Dedicatoria:

Dedico este esfuerzo a

Luis Elias, mi padre.

Francisco Javier, mi hermano.

(Q.E.P.D.)

Agradecimientos

Mis sentimientos de gratitud están dirigidos a quienes depositaron en mí la confianza para la realización de la presente investigación:

-A mis directores y tutora de tesis.

Doctores Ignacio Dávila González, Felix Lorente Toledano, María Isidoro García y Catalina Sanz Lozano

Por su esfuerzo, empeño y dedicación, pero también por su rectitud de consciencia.

-A los servicios de Bioquímica, Inmunoalergia y Hematología y a todos aquellos a quienes conocí durante mi paso por ellos

Por acogerme en mí proceso de formación, y compartir conmigo un poquito de sí.

-A mis amigos

Porque han sido maestros en el arte del tiempo

-A mi mamá, hermanos, sobrinos y a toda mi familia

Por su apoyo incondicional no sólo en mi vida, sino también en mi formación

-A mi esposo.

Porque olvidándose de sí me acompañó y apoyo en la búsqueda de mis sueños.

-A Dios

Que los ha puesto a todos ellos en mi camino, para perseverar en este esfuerzo.

La ciencia es un cementerio de ideas muertas, aunque de ellas puede salir la vida.

Unamuno

TABLA DE CONTENIDOS

1	Introducción	1
1.1	Breve recuento histórico	1
1.2	Descripción y composición de una vacuna	15
1.2.1	Componentes de las vacunas	17
1.2.2	Alergoides	19
1.3	Mecanismo de acción de la inmunoterapia	21
1.3.1	Células Presentadoras de Antígenos (CPA) y sus receptores	23
1.3.2	Respuestas de los linfocitos T y sus receptores	29
1.3.3	Efectos sobre la respuesta de anticuerpos específicos de alérgeno	34
1.4	Eficacia y seguridad de la inmunoterapia	39
1.4.1	Eficacia y Seguridad de la Inmunoterapia Sublingual	39
1.4.2	Biomarcadores de eficacia	43
1.5	Vaccinómica	48
2	Hipótesis	55
3	Objetivos	59
3.1	Objetivo principal	59
3.2	Objetivos específicos	59
4	Material y métodos	63
4.1	Parámetros clínicos	63
4.1.1	Individuos	63
4.1.2	Visitas	66
4.1.3	Variables	72
4.2	Análisis molecular	81
4.3	Análisis estadísticos	101
4.3.1	Análisis estadístico de la eficacia	102
4.3.2	Estudio estadístico de asociación genética entre casos y controles	103
	- Análisis descriptivo	104
	- Análisis bivariante	104
	-Control estadístico	104
	- Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas	105
	- Análisis de haplotipos y diplotipos	106
5	Resultados	109
5.1	Grupos integrantes del estudio	109
5.2	Análisis descriptivo clínico del estudio de inmunoterapia	112
5.2.1	Estudio de eficacia (población de análisis)	113

5.2.2 Características demográficas y exploración física.....	114
5.3 Resultados de eficacia clínica	115
5.3.1 Variable principal de eficacia: suma de las puntuaciones de síntomas y de medicación en la época polínica.....	115
5.3.2 Eficacia mediante el empleo de la puntuación media de los síntomas ajustada (AdSS)	116
5.3.3 Cuestionario para la calidad de vida para la rinitis (RQLQ).....	118
5.3.4 Escala visual analógica (EVA)	120
5.3.5 PRUEBA DE PROVOCACIÓN NASAL.....	122
5.4 Resultados de eficacia inmunoserológicos	127
5.4.1 Parámetros inmunoserológicos (inmunoglobulinas).....	127
5.4.2 Analisis de inmunoglobulinas correlaciones	130
5.5 Niveles de citocinas.....	131
5.6 Efecto de la inmunoterapia en los pacientes monosensibilizados o polisensibilizados: comparación pre y postratamiento	133
5.7 Estudio genético	135
5.7.1 Distribución en la población control.....	135
5.7.2 Estudio de asociación génica	136
6 Discusión.....	143
6.1 Estudio de eficacia	143
6.2 Análisis de las inmunoglobulinas	147
6.3 Análisis de los niveles de citocinas	151
6.4 Asociación génica	154
6.4.1 Distribución de snp en la población control	154
6.4.2 Estudio de asociación génica	155
7 Conclusiones.....	167

LISTA DE ABREVIATURAS Y DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

AdSS: Escala de la Puntuación media de los Síntomas Ajustados

AQLQ: Cuestionario de calidad de vida para asma

ARIA: Rinitis Alérgica y su Impacto sobre el Asma

CPA: Células presentadoras de antígenos

CPAo: Células presentadoras de antígenos orales

CD: Célula dendrítica

CDm: Células dendríticas mieloides

CDp: células dendríticas plasmocitoides

CDs: Células dendríticas

CL: Células de Langerhans

CLo: Células de Langerhans orales

DE: Desviación estándar

DPP: Despigmentado Polimerizado (1 DPP es el resultado de despigmentar y polimerizar un HPE_L)

EVA: Escala Visual Analógica

FcεRI: Receptores de alta afinidad para IgE

Fcγ: Receptores para IgG

G1: Grupo 1 (dosis baja)

G2: Grupo 2 (dosis alta)

GP: Grupo Placebo

GINA: Iniciativa Global para el Asma

HEP_L: *Histamine Equivalent Prick Leti*

IT: Inmunoterapia

ITA: Inmunoterapia con alérgeno

ITSC: Inmunoterapia subcutánea

ITSL: Inmunoterapia sublingual

ITT: Intención de tratar

RQLQ: Cuestionario de Calidad de Vida para pacientes con Rinoconjuntivitis

sIgE: Inmunoglobulina E en suero

TCR: Receptor antigénico de los linfocitos T

V1: Visita 1

V2: Visita 2

V3: Visita 3

V4: Visita 4

INTRODUCCION

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Breve recuento histórico

Es conocido que el sistema inmunitario es el “guardián” que hace posible la vida en un medio hostil, con enemigos agresivos, como virus, bacterias, hongos y parásitos, que debe saber identificar y destruir. En ciertas situaciones en las que determinadas alteraciones congénitas o adquiridas han modificado su normal funcionamiento, la biotecnología, a través de la inmunoterapia¹, ha logrado estimular o reponer el sistema inmunitario, en unos casos, o aminorar los efectos secundarios de ciertos tratamientos, en otros. Hoy tal propósito se logra poniendo a disposición de los pacientes un conjunto de terapias (*θεραπεία/therapeia*)², cuya finalidad es la curación o el alivio o mejoría de los síntomas: los anticuerpos monoclonales, las vacunas y los denominados factores de crecimiento constituyen un buen ejemplo de estos tratamientos.

Para empezar, cabe citar al rey griego Mitrídates IV (132 – 63 a. C.)³, quien, en un intento de no ser envenenado, acostumbraba a experimentar los efectos de los tóxicos –no sólo consigo mismo, sino con delincuentes convictos-, buscando

¹El término de inmunoterapia de acuerdo a la Real Academia Española: Tratamiento de enfermedades mediante la potenciación o debilitamiento de los mecanismos inmunitarios. Real Academia Española [Internet]. Dle.rae.es. 2017 [citado el 21 de mayo de 2017]. Disponible en: <http://dle.rae.es/?w=Inmunoterapia>.

²Dicciogriego [Internet]. Dicciogriego.es. 2017 [citado el 21 de mayo de 2017]. Disponible en: [http://www.dicciogriego.es/index.php#esp?lema=483&n=483&s=tratar \(medicamento\)](http://www.dicciogriego.es/index.php#esp?lema=483&n=483&s=tratar (medicamento)).

³Mitrídates VI (132 a.c. - 63 a.c.) llamado *Eupator Dionysius*, también conocido como Mitrídates el Grande, rey de Ponto desde 120 a.C. hasta su muerte en 63 a.C. en Asia Menor. Hombre ambicioso cuyo propósito de conquistar Bitinia le llevó a conflictos con la República Romana, en plena expansión.

así un antídoto que le preservara de posibles intentos de asesinato, encontrando así el *mitridato*⁴, una mezcla de sustancias vegetales y animales atribuidas a su invención, que le permitió hacerse inmune, en el sentido lato de la palabra. Según cuenta el historiador romano Apiano (Alejandría, Egipto, 95 d. C. – 165 d. C.), cuando fue derrotado por Pompeya, Mitrídates VI intentó suicidarse ingiriendo veneno para evitar su captura por los romanos; sin embargo, al estar inmunizado debió recurrir a uno de sus oficiales para que le matase a espada⁵. En la Grecia clásica, Hipócrates (460 a. C. – 370 a.C.), por su parte, refirió los síntomas del asma, aunque sin denominarla como tal, sino como ataque paroxístico, más grave que una simple disnea. La condición de asma espasmódica se comparó con un ataque de epilepsia, que fue interpretado como un castigo divino. Por su parte, Gerolamo Cardano⁶ realizó importantes anotaciones sobre la relación entre almohadas de plumas y dificultades respiratorias.

En la época moderna 865-932 se hizo referencia a coriza, sintomatología similar a la rinitis, referenciado por Pelta

“el médico árabe de origen persa Rhazes (865-932), que ejerció en el primer cuarto del siglo X y está considerado como el más eminente galeno musulmán medieval, tituló una

⁴El mitridato o antídoto de Mitrídates (*mithridaticus antidotus*) es un antídoto antiveneno de la antigua farmacopea en cuya composición entraban entre otros compuestos, según lo describe Aulio Cornelio Celso, cien años después de la muerte de Mitrídates en su obra *De Medicina Vol. 23* (año 30 d.C), balsamita, cálamo, hypericum, goma arábiga, sagapenum, zumo de acacia, iris ilirio, cardamomo, anís, nardo gálico (valeriana), genciana, rosa, amapola, perejil, casia, saxífraga, cizaña, pimienta larga, estoraque (resina de liquidambar), castóreo, olíbano, jugo de *Cytinus hypocistis*, mirra, opopónaco, Malabathrum, flor de junco redondo, resina de trementina, gálbano, semillas de zanahoria de creta, nardo, bálsamo de la Meca, raíz de ruibarbo, azafrán, jengibre, canela. Todo esto se macera y se vierte en miel. Para el envenenamiento, una porción del tamaño de una almendra se disuelve en vino.

⁵Véase Medicina de Celso en el Renacimiento, Valladolid, Universidad, Servicio de publicaciones de la Universidad de Valladolid, 2003, ISBN 84-8448-213- 8.

⁶Gerolamo Cardano, o Girolamo Cardano (24 de sep. 1501 a 21 sep. 1576), médico notable, además de un célebre matemático italiano del renacimiento, un astrólogo de valía y un estudioso del azar.

de sus publicaciones *Una disertación sobre la causa de la coriza que ocurre en la primavera, cuando las rosas liberan su perfume*. Es probablemente la primera descripción en la historia de la Medicina de la *rinitis alérgica estacional* por sensibilización al polen”⁷

En el siglo XVIII, Ramazzini (1663-1714)⁸ detalló las reacciones que sufrían panaderos, cuidadores de animales y personas que trabajaban con sustancias vegetales.

John Floyer en 1726 como refiere Senent “asoció los síntomas asmáticos de una serie de personas con el hecho de haber visitado unas bodegas, donde había una elevada humedad y gran cantidad de mohos”⁹. Adicionalmente hizo referencia al asma en su libro *Treatise of the Asthma* (1765). En el Siglo XIX, René Theophile-Hyacinthe Laennec¹⁰ (1781–1826), inventor del estetoscopio, estaba convencido que el broncoespasmo era la principal manifestación de la enfermedad (asma).

En 1819, el médico inglés John Bostock¹¹, fue el primero en describir la polinosis (el mismo padecía la inflamación periódica de la conjuntiva ocular, que llamó Fiebre del Sena); entre los años 1819 a 1828 sólo pudo encontrar 28 casos más

⁷Pelta Fernández R. Historia del desarrollo de los conocimientos en Alergología. Alérgicos ilustres. En: Zubeldía J.M, Baeza M. L, Jáuregui I, Senent J. Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA [Internet] Bilbao: Fundación BBVA; 2012. [citado el 21 de mayo de 2017]. p. 33. Disponible en: <http://alergiafbbva.es/el-tratamiento-de-las-enfermedades-alergicas/52-las-vacunas-contr-la-aler-gia-o-inmunoterapia/#>.

⁸Bernardino Ramazzini (Capri, 3 de nov 1663, Padua, 5 nov. 1714) fue un médico italiano, considerado el fundador de la medicina del trabajo. En 1700 escribió el primer libro importante sobre enfermedades profesionales e higiene industrial.

⁹ Senent Sánchez C. Alergia a la humedad: ¿qué son los hongos y cómo evitarlos. En: Zubeldía J.M, Baeza M. L, Jáuregui I, Senent J. Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA [Internet] Bilbao: Fundación BBVA; 2012. [citado el 21 de mayo de 2017]. p. 99. Disponible en: <http://alergiafbbva.es/el-tratamiento-de-las-enfermedades-alergicas/52-las-vacunas-contr-la-aler-gia-o-inmunoterapia/#>.

¹⁰René Theophile-Hyacinthe Laennec (Quimper, GB 17 febrero. 1781 - 13 Agosto. 1826). Médico francés, inventor del estetoscopio.

¹¹John Bostock (1773-1846) fue un médico Inglés, científico y geólogo de Liverpool. Bostock murió de cólera en 1846.

de éste raro proceso en toda Inglaterra. Publicó un comunicado en la revista de las Sociedad Médico-Quirúrgica de Londres, sobre la *Fiebre del Sena*. En 1828 como sostiene Pelta

“Bostock publicó un trabajo con observaciones de 18 casos similares al suyo, empleando por vez primera el término *fiebre del heno*, pero rechazando su idea inicial de que hubiera relación con el heno o pasto seco, por considerarla errónea. Hoy se sabe que la causa de la rinoconjuntivitis alérgica primaveral es el polen, y que tal afección no causa fiebre, pero dicho término ha hecho fortuna y sigue usándose por algunos médicos y pacientes. A partir de las observaciones de Bostock surgió el interés de otros galenos por el estudio de la enfermedad, que, a diferencia de lo que sucedía en su época, en la que era una rareza, hoy alcanza una frecuencia notable.”¹²

En 1864, Samuel James Augustus Salter¹³ describió la correlación existente entre el asma¹⁴ y la inhalación de ciertas partículas de origen animal y vegetal. En 1873 Charles Harrison Blackley¹⁵ publicó “*Investigaciones experimentales sobre las causas y la naturaleza de Catarrhus aestivus*”, que es generalmente aceptado como el primer texto que muestra evidencia del polen del aire como la causa de la fiebre del heno. Fue el pionero en la realización de las pruebas

¹²Pelta Fernández R. Historia del desarrollo de los conocimientos en Alergología. Alérgicos ilustres. En: Zubeldia J.M, Baeza M. L, Jáuregui I, Senent J. Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA [Internet] Bilbao: Fundación BBVA; 2012. [citado el 21 de mayo de 2017]. p. 34. Disponible en: <http://alergiafbbva.es/el-tratamiento-de-las-enfermedades-alergicas/52-las-vacunas-contr-la-alergia-o-inmunoterapia/#>.

¹³Samuel James Augustus Salter (15 diciembre. 1825 a 2 agosto. de 1897), destacado médico, cirujano dental del King's College Hospital, y naturalista inglés.

¹⁴Hay evidencias de asma desde el antiguo Egipto, y antes aún. El Papiro de Georg Ebers, encontrado en Egipto en la década de 1870, contiene jeroglíficos de más de 700 recetas médicas. El término *asma* viene del verbo griego *aazein*, el cual significa jadear, exhalar con la boca abierta, respirar fuerte.

¹⁵Charles Harrison Blackley (5 abril. 1820 - 4 septiembre. 1900). Su obra más importante fue un libro titulado *las investigaciones experimentales sobre las causas y la naturaleza de aestivus Catarrhus*, publicado en 1873.

cutáneas y llevó a cabo los primeros ensayos sobre la conjuntivitis nasal y bronquial. Posteriormente Helena Curtis¹⁶ destacó por su trabajo y aportaciones sobre extractos de polen.

En la década de 1870 se dio el descubrimiento de los mastocitos, basófilos y eosinófilos por parte de Paul Ehrlich (1854 – 1915)¹⁷. En el Siglo XX es preciso hacer mención, entre otros, de Charles Robert Richet (1850 – 1935), que describió el proceso de la anafilaxia¹⁸.

Las primeras descripciones de la administración de polen como tratamiento aparecieron hacia 1900¹⁹ y los primeros estudios clínicos con esta administración se llevaron a cabo solo unos pocos años más tarde²⁰. En 1906, Clement Von Pirquet²¹, de acuerdo a Pelta²²., introdujo el concepto de *alergia*, justificando su aportación al afirmar “Necesitamos un nuevo término más general para describir el cambio experimentado por un organismo tras su contacto con un veneno orgánico, bien sea vivo o inanimado” (reacción antígeno anticuerpo). Para

¹⁶Helena Curtis (1924 - 2005) fue una notable escritora científica, y autora de libros de texto de Biología. En reconocimiento a su contribución a la enseñanza de la biología, Curtis fue elegida miembro de la Asociación Americana para el Avance de la Ciencia en 1988, y fue miembro de la Asociación Nacional de Escritores Científicos.

¹⁷ Kay AB. Landmarks in Allergy during the 19th Century. Chem Immunol Allergy. 2014;100:21-6.

¹⁸La reacción por predisposición de algunas personas, a la administración de un medicamento, la ingestión de un alimento o la picadura de una abeja o de una avispa, consistente en la aparición de ronchas en la piel, hinchazón de ésta o de la glotis, asma, vómitos, diarrea, e incluso sensación de mareo por descenso de la tensión arterial (choque anafiláctico), es lo que Richet acuñó en 1902 con el término anafilaxia. El francés Charles Robert Richet fue médico y catedrático de la Universidad de La Sorbona.

¹⁹Curtis HH. The immunizing cure of hay fever. Med News (NY). 1900; 77:16 –18.

²⁰Black JH. The oral administration of pollen. J Lab Clin Med. 1927; 12:1156. Black JH. The oral administration of pollen: clinical report. J Lab Clin Med. 1928; 13:709.

²¹Clemens Peter Freiherr von Pirquet von Cesenatico (1874 - 28 Feb. 1929).

²²Pelta Fernández R. Historia del desarrollo de los conocimientos en Alergología. Alérgicos ilustres. En: Zubeldía J.M, Baeza M. L, Jáuregui I, Senent J. Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA [Internet] Bilbao: Fundación BBVA; 2012. [citado el 21 de mayo de 2017]. p. 31. Disponible en: <http://alergiafbbva.es/el-tratamiento-de-las-enfermedades-alergicas/52-las-vacunas-contr-la-alergia-o-inmunoterapia/#>

expresar este concepto general en el modo de reaccionar, sugirió el término *alergia*.

William Philip Dunbar (1863 – 1922) fue un pionero de la inmunoterapia desarrollando una “antitoxina” que denominó “*Polantina*”, citado en el primer artículo que describía el éxito de la administración de vacunas contra la alergia, que apareció en *The Lancet*²³, en 1911. Era un artículo corto que anunciaba una nueva terapia que más tarde sería llamada *inmunoterapia con alérgenos*, que podría tener éxito en el tratamiento de la fiebre del heno. El artículo se tituló “*Inoculación profiláctica contra la fiebre del heno*” y lo escribió Leonard Noon (1878 – 1913), quien inmunizó con un extracto de *Phleum Pratense*; Noon definió inicialmente la polinosis o fiebre del heno “*como una forma de catarro recurrente que afecta a ciertos individuos durante los meses de mayo, junio y julio*”. Lo atribuyó a lo que calificó como una “*toxina soluble que se encuentra en el polen de las gramíneas*”²⁴. Noon depositó una pequeña cantidad de una solución (extracto) de polen de gramíneas en el ojo del paciente y utilizó esta prueba de provocación en el diagnóstico y determinación de la respuesta al tratamiento; prueba que no era nueva²⁵: Blackley la describió como una forma de demostrar que el polen causa fiebre del heno. La hipótesis de Noon fue que mediante la inyección de pequeñas cantidades de esta “toxina” del polen, se podría inducir un estado de inmunidad y el paciente podría mejorar. Blackley, tras causarse

²³Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 1911; 177; 1572-1573.

²⁴En honor a la verdad esta calificación se debe a Dunbar

²⁵Originalmente fue desarrollada por Dunbar

una fisura en la piel y frotarse sobre ella con una gramínea descubrió las pruebas cutáneas²⁶.

Rober A. Cooke considerado el padre de la alergia estadounidense comenzó sus estudios de polen y sensibilización en 1910²⁷, en conjunto con Albert Van der Veer, en un estudio realizado a 621 pacientes con alergopatías observaron que el componente genético era importante en la presencia de la afección de enfermedades alérgicas independientemente del componente ambiental. En 1923 Arthur Coca (1875-1959) según refiere²⁸ acuñó el termino *atopia* (*atopos* significa “inhabitual” o “raro”, para referirse a los padecimientos de algunos sujetos, que sufrían rinitis, asma o urticaria y en los que existía un condicionante hereditario. Posteriormente, en 1935, Cooke en estudios serológicos apoyados por experimentos transfusionales donde los pacientes habían recibido extractos hiposensibilizantes, encontró los “anticuerpos bloqueantes”^{29,30}

²⁶Pelta Fernández R. Historia del desarrollo de los conocimientos en Alergología. Alérgicos ilustres. En: Zubeldía J.M, Baeza M. L, Jáuregui I, Senent J. Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA [Internet] Bilbao: Fundación BBVA; 2012. [citado el 21 de mayo de 2017]. p. 34. Disponible en: <http://alergiafbbva.es/el-tratamiento-de-las-enfermedades-alergicas/52-las-vacunas-contr-la-alergia-o-inmunoterapia/#>

²⁷Finogold I, Dockhorn RJ, Ein D, Dolen WK, Oppenheimer J, Potter LH. Immunotherapy throughout the decades: from Noon to now. Ann Allergy Asthma Immunol. 2010 Nov; 105 (5):328-36.

²⁸Pelta Fernandez R. Historia del desarrollo de los conocimientos en Alergología. Alérgicos ilustres. En: Zubeldía J.M, Baeza M. L, Jáuregui I, Senent J. Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA [Internet] Bilbao: Fundación BBVA; 2012. [citado el 21 de mayo de 2017]. p. 32. Disponible en: <http://alergiafbbva.es/el-tratamiento-de-las-enfermedades-alergicas/52-las-vacunas-contr-la-alergia-o-inmunoterapia/#>

²⁹Cooke r. Studies on immunity in a type of human allergy (hay fever): serologic response of non-sensitive individuals to pollen injections. journal of experimental medicine. 1937; 66(6):689-696.

³⁰Cooke r. The antibody mechanisms of ragweed allergy. electrophoretic and chemical studies: i. the blocking antibody. journal of experimental medicine. 1955; 101(2):177-196.

Freeman³¹, compañero de trabajo de Noon, extendió las observaciones sobre la inmunoterapia del polen cuando, en conjunto con Noon, inmunizó con extractos de polen de gramínea a veinte individuos, empleando dosis crecientes de polen, en período estacional y no estacional. Los resultados fueron en general satisfactorios. Los estudios de inmunización de Noon y Freeman se mantuvieron como tratamiento empírico durante más de cuarenta años. Sólo en 1954 la eficacia del procedimiento pudo ser demostrada científicamente tras el primer ensayo controlado y su posterior publicación³². Por las mismas fechas, en Norteamérica, Lowdermilk y Koessler (1980 – 1925) publicaron trabajos similares con vacunas contra el polen.

Puede decirse que a partir de este momento comenzó a emplearse formalmente la inmunoterapia para tratar enfermedades alérgicas causadas por alérgenos inhalados. A lo largo de las siguientes décadas, la calidad de las vacunas fue mejorando, especialmente a raíz del descubrimiento, en 1966, de la inmunoglobulina E (IgE), por parte del matrimonio Ishizaka y Johansson³³. La caracterización de esta inmunoglobulina humana, que se une específicamente a las proteínas alérgicas, permitió avanzar en el control de la eficacia de las vacunas de alergia.

En la figura 1 se muestra la evolución de la Inmunoterapia

³¹Freeman J. Rush inoculation with special reference to hay fever treatment. *Lancet* 1930; 1:744.

³²Frankland AW, Augustin R. Prophylaxis of summer hayfever and asthma: controlled trial comparing crude grass pollen extracts with isolated main protein component. *Lancet* 1954; 1:1055.

³³Olaguibel J.M. IgE: aproximación histórica. *Arch Bronconeumol*. 2006;42 Supl 1:3-5

En 1923 Besche confirmó la transferencia pasiva de la sensibilidad a los alérgenos. En 1940 Loveless demostró que el anticuerpo era estable hasta los 56°C. Como se ha comentado, en 1954 Frankland y Agustín realizaron el primer estudio de inmunoterapia controlado con placebo. En 1957 Johnstone, estudió 112 niños con rinitis y asma por pólenes y los dividió en 3 grupos según la dosis de inmunoterapia que recibieron: altas dosis, bajas dosis y placebo, observando mejoría del asma en el 68%, 19% y 7%, respectivamente³⁴.

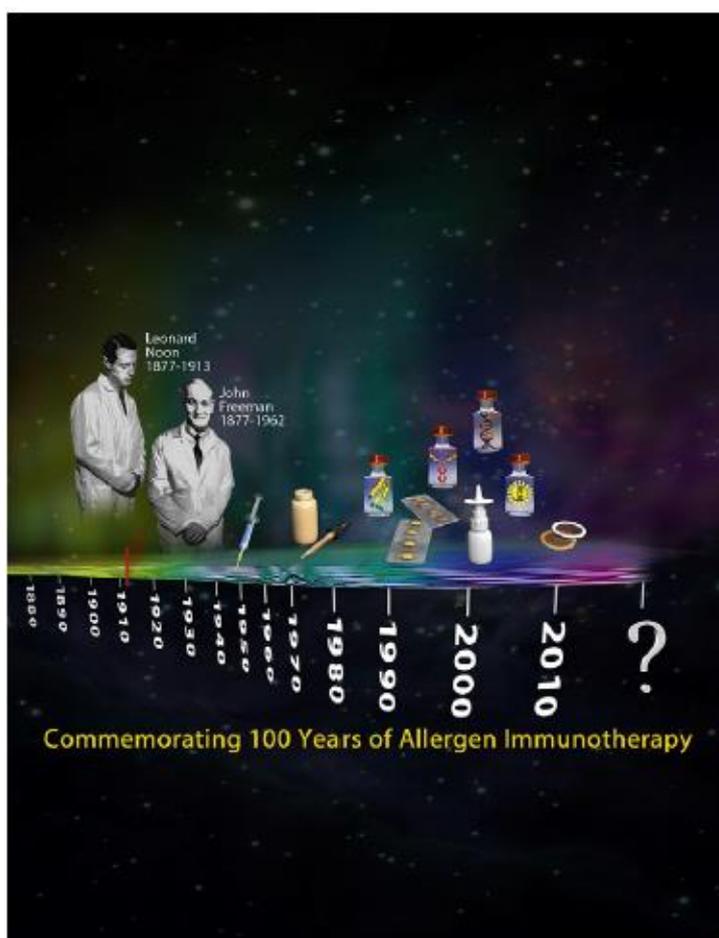


Figura 1. Conmemoración de los 100 años de la inmunoterapia³⁵

³⁴Johnstone D. Study of the Role of Antigen Dosage in the Treatment of Pollenosis and Pollen Asthma. Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine. 1957; 94(1):1.

³⁵Durham SR, Leung DY. The hundred years of allergen immunotherapy: time to ring the changes. J Allergy Clin Immunol. 2011; Jan; 127(1):3-7.

En 1978 Norman y Lichtenstein³⁶ cambiaron los términos desensibilización o hiposensibilización por el de *inmunoterapia específica* para describir el procedimiento que caracteriza al tratamiento específico de las enfermedades alérgicas.

A partir de entonces se iniciaron estudios inmunológicos y ensayos clínicos. La OMS, desde 1998, respalda la inmunoterapia como tratamiento de las enfermedades alérgicas³⁷.

La inmunoterapia específica de alérgeno o vacunación con alérgenos consiste en la administración al paciente alérgico (generalmente por vía parenteral), de dosis habitualmente crecientes del alérgeno o alérgenos (“extractos”) causantes de su reacción alérgica. Esta comienza por una primera fase de iniciación hasta llegar a una dosis máxima o dosis de mantenimiento, la cual se administra durante un período largo de tiempo con el fin de minimizar la sintomatología que se produce por exposición natural al agente desencadenante e inducir la tolerancia (*hiposensibilización*) necesaria para controlar y/o modificar la respuesta y con ella el curso natural de la enfermedad alérgica.³⁸

Continuando, en la década de los 80 se realizaron varios ensayos clínicos investigando la inmunoterapia oral, ensayos realizados por Rebien y cols³⁹,

³⁶Norman PS, Lichtenstein LM. The clinical and immunologic specificity of Immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 1978 Jun; 61(6):370-7.

³⁷ Bousquet J, Lockett RF, Malling H.G. Who Position Paper. Allergen Immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *Allergy* 1998; 53: 1-42.

³⁸Sub-Lingual Immunotherapy *World Allergy organization Position Paper 2009*

³⁹**Rebien W, Puttonen E, Maasch HJ, Stix E, Wahn U. Clinical and immunological response to oral and subcutaneous immunotherapy with grass pollen extracts. A prospective Study. *Eur J Pediatr.* 1982 Jul;138(4):341-4.**

Taudorf y cols entre otros^{40,41}; no obstante, los resultados fueron controvertidos y se presentaron algunos eventos adversos gastrointestinales, que obligaron a abandonar esta vía de administración.

En 1982 Gerald J. Gleich introduce el concepto de la IgG⁴² específica de alérgeno como "anticuerpo bloqueante"⁴³

Hasta la década de 1980 la única forma de administrar la Inmunoterapia (IT) era la vía subcutánea, pero la disponibilidad en el mercado extractos de alérgeno de alta potencia biológica planteó la cuestión de la seguridad debido a una serie de reacciones sistémicas mortales^{44,45}

Después del primer ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo con la inmunoterapia sublingual (ITSL) en adultos sensibles a ácaros en 1986⁴⁶, esta surgió como una alternativa eficaz a la inmunoterapia subcutánea, siendo en la actualidad, ampliamente empleada en Europa y no tanto en EE.UU⁴⁷.

⁴⁰Taudorf E, Weeke B. Orally administered grass pollen. *Allergy*. 1983; 38:561–564.

⁴¹Urbanek R, Gehl R. Efficacy of oral hyposensitization treatment in house dust mite allergy (author's transl)[resumen] 1982;130:150–152.

⁴²La Inmunoglobulina G (IgG) es una de las cinco clases de anticuerpos humorales producidos por el organismo, se trata de la predominante en los fluidos internos del cuerpo, como son sangre, el líquido cefalorraquídeo y el líquido peritoneal. Sintetizada por el organismo en respuesta a la invasión de bacterias, hongos y virus, es la inmunoglobulina más abundante del suero, con una concentración de 600-1.800 mg por 100 ml. y constituye el 80% de las inmunoglobulinas totales.

⁴³Gleich GJ, Zimmermann EM, Henderson LL, Yunginger JW. Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six-year prospective study. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 70:261-71.

⁴⁴CSM Update: Desensitising vaccines. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)* (1986); 293 (6552), 948.

⁴⁵Lockey RF, Benedikt LM, Turkeltaub PC, Bukantz SC. Fatalities from immunotherapy (IT) and skin testing (ST). *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79; 660-77.

⁴⁶Scadding GK, Brostoff J. Low dose sublingual therapy in patients with allergic rhinitis due to house dust mite. *Clin Allergy* 1986; 16:483-91.

⁴⁷Canonica GW, Bousquet J, Casale T, Lockey RF, Baena-Cagnani CE, Pawankar R, et al. Sublingual immunotherapy: World Allergy Organization Position Paper 2009. *Allergy* 2009; 64(suppl 91):1-59.

En la revisión del 2008 hacen referencia a los primeros estudios realizados a la población pediátrica con ITSL⁴⁸.

En 1993, la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI) indicó que la SLIT podría ser considerada como un "camino prometedor" para la desensibilización⁴⁹.

En 1998, cinco años después, la OMS, basándose en los resultados de 8 ensayos clínicos, aleatorizados, doble ciego y controlado con placebo, declaró que la ITSL "puede ser considerada como una opción viable alternativa a la vía subcutánea en adultos⁵⁰. En el mismo año, la EAACI elaboró un documento de posición sobre las vías de administración no inyectables, declarando que el uso de ITSL en la práctica clínica se justifica por la eficacia comprobada y el perfil de seguridad favorable⁵¹.

En 1998 se publica el papel de la IL-10 en la inmunoterapia específica⁵².

En 2001, el documento de posición Rinitis Alérgica y su impacto en el Asma (ARIA) aceptó el uso de la ITSL en adultos y niños, como una alternativa válida

Cox LS, Larenas Linnemann D, Nolte H, Weldon D, Finegold I, Nelson HS. Sublingual immunotherapy: a comprehensive review. *J Allergy Clin Immunol* 2006. 117:1021-35.

⁴⁸Sopo SM, Macchiaiolo M, Zorzi G, Tripodi S. Sublingual immunotherapy in children with asthma or rhinoconjunctivitis: not enough evidence because of poor quality of the studies; a systematic review of literatura. *Arch Dis Child* 2004;89:620–624. doi: 10.1136/adc.2003.030411.

⁴⁹Malling H, Weeke B, eds. Immunotherapy. Position Paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy*. 1993; 48 (Suppl 14):9 –35.

⁵⁰Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, eds. World Health Organization Position Paper. Allergen immunotherapy: therapeutical vaccines for allergic diseases. *Allergy* 1998; 53:1– 42.

⁵¹ Malling HJ, Abreu-Nogueira J, Alvarez-Cuesta E, Bjorksten B, Bousquet J, et al. EAACI Position Paper on local immunotherapy. *Allergy*.1998; 53:933–944.

⁵²Akdis CA, Blesken T, Akdis M, W€uthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998) 1021:98-106.

a la inmunoterapia subcutánea (ITSC)⁵³, que fue confirmado en su actualización en 2008⁵⁴.

A partir de 2003 se ha demostrado que la inmunoterapia sublingual es un tratamiento eficaz, seguro y tolerable, llegando a constituir una alternativa para la vía subcutánea⁵⁵.

En relación con la alergia a alimentos se han publicado diversos estudios que hacen referencia al beneficio de la inmunoterapia sublingual^{56,57}.

En 2010 se publicó un ensayo doble ciego con tabletas que contenían polen de gramíneas, confirmando la remisión a largo plazo, inclusive hasta un año, después de haber recibido tratamiento durante 3 años⁵⁸.

A continuación se muestra la tabla 1 representativa de los 100 años de inmunoterapia con alérgenos.

⁵³Bousquet J, Van Cauwenberge P, eds. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(Suppl):S147–S334

⁵⁴ Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008;63 (Suppl 86):8 –160.

⁵⁵ Canonica GW, Passalacqua G. Noninjection routes for immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:437-48.

⁵⁶ Blumchen K, Ulbricht H, Staden U, Dobberstein K, Beschoner J, de Oliveira LC, et al. Oral peanut immunotherapy in children with peanut anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:83-91.

⁵⁷ Thyagarajan A, Varshney P, Jones SM, Sicherer S, Wood R, Vickery BP, et al. Peanut oral immunotherapy is not ready for clinical use. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:31-2.

⁵⁸ Durham SR, Emminger W, Kapp A, Colombo G, de Monchy JG, Rak S, et al. Long-term clinical efficacy in grass pollen-induced rhinoconjunctivitis after treatment with SQ-standardized grass allergy immunotherapy tablet. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125 :131-8.

Tabla 1. Principales hitos de los primeros 100 años de inmunoterapia con alérgenos

Autor(es)	Hitos más importantes	Año
Noon	Primer ensayo Inmunoterapia subcutánea polen de gramíneas	1911
Prausnitz	Trasferencia pasiva de suero inmediata reactividad test prueba cutánea de anticuerpos IgE (Reagina)	1921
Freeman	Primer ensayo de Inmunoterapia rápida con polen de gramíneas.	1930
Cooke et al	Concepto de anticuerpo bloqueante de suero.	1935
Franklandy Augustin	Primer ensayo doble ciego controlado-placebo de Inmunoterapia subcutánea con polen de gramíneas.	1954
Lowell and Franklind	Polen de gramíneas eficaz en Inmunoterapia subcutánea con mezclas multialérgicas.	1965
Ishizaka et al Johansson y Bennich	Descubrimiento del Anticuerpo IgE.	1966
Johnstone y Dutton	Beneficio a largo plazo de inmunoterapia subcutánea en niños.	1968
Hunt et al	Eficacia de veneno de himenóptero vs extracto de todo el cuerpo Inmunoterapia subcutánea.	1978
Warner et al	Suspensión de la respuesta asmática tardía después de Inmunoterapia con ácaros.	1978
Rocklin et al	Rol de las células T supresoras antígeno específicas en Inmunoterapia.	1980
Gleich et al	Incrementos tempranos en los niveles de IgE después de Inmunoterapia subcutánea con ambrosia, despunte de IgE estacional.	1982
Scadding yBrostoff	Primer ensayo doble ciego de Inmunoterapia sublingual.	1986
Creticos et al	Inhibición de la inflamación alérgica en el órgano diana después de inmunoterapia de ambrosia.	1989
Rak et al	Inhibición de la respuesta asmática tardía después de la inmunoterapia d abedul en adultos.	1991
Norman et al	Primer ensayo de Inmunoterapia subcutánea péptido células T en pacientes con alergia a gatos.	1996
Akdis et al	Papel de la IL 10 y células T regulatorias en Inmunoterapia con venenos.	1998
Passalacqua et al	Inmunoterapia sublingual con alergoide de ácaro de polvo doméstico.	1998
Durham et al	Eficacia clínica a largo plazo de Inmunoterapia subcutánea con polen de gramíneas.	1999
Niederberger et al	Primer ensayo de Inmunoterapia subcutánea con alergen recombinantes en pacientes con alergia al abedul.	2004
Creticos et al	Inmunoterapia subcutánea con agonistas de los TLR9 de Ambrosia.	2006
Jacobsen et al	Prevención del asma después de Inmunoterapia subcutánea con polen en niños. (el estudio PAT).	2007
Durham et al	Eficacia clínica a largo plazo de Inmunoterapia sublingual con polen de gramíneas.	2010

Tomada de Durham y Leung 2011⁵⁹

⁵⁹Durham SR, Leung DY. The hundred years of allergen immunotherapy: time to ring the changes. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Jan; 127(1):3-7. doi: 10.1016/j.jaci.2010.11.032.

1.2 Descripción y composición de una vacuna

El sistema inmune es un sistema adaptativo complejo con propiedades como la memoria y la autorregulación; la respuesta final dependerá de múltiples interacciones que comprenden redes bioquímicas intracelulares, redes de comunicación intercelular y redes espacio-temporales de tráfico celular⁶⁰ (ver figura 2).

Con el fin de reforzar el sistema inmune contra los diferentes patógenos, el ser humano ha creado herramientas entre las que destacan, por su excelencia, las vacunas, entendiendo por vacunas cualquier preparación destinada a generar inmunidad contra una enfermedad, estimulando la producción de anticuerpos. Puede tratarse, por ejemplo, de una suspensión de microorganismos muertos o atenuados, o de productos o derivados de microorganismos. El método más habitual para administrar las vacunas es la inyección, aunque algunas se administran con un vaporizador nasal u oral⁶¹. Por su parte, se entiende por inmunidad (del lat. *immunitas*, *-ātis*.) al “estado de resistencia, natural o adquirida, que poseen ciertos individuos o especies frente a determinadas acciones patógenas de microorganismos o sustancias extrañas”.

La inmunidad contra un microorganismo puede adquirirse de tres formas: activa, pasiva o adoptiva. La inmunidad activa es la que se adquiere frente a un agente extraño después de haber tenido contacto directo con el mismo, ya sea por una

⁶⁰Furman D, Davis. MM. Nuevos enfoques para la comprensión de la respuesta inmune a la vacunación y la infección. *Vaccine*, 2015-09-29, Volumen 33, Número 40, Páginas 5271-5281. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.117>.

⁶¹ Organización Mundial de la Salud. Vacunas [Internet]. [citado el 21 de mayo de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/topics/vaccines/es/>.

exposición natural o artificial (como la inmunización o vacunación). Esta inmunidad es de larga duración e incluso a veces se mantiene de por vida.

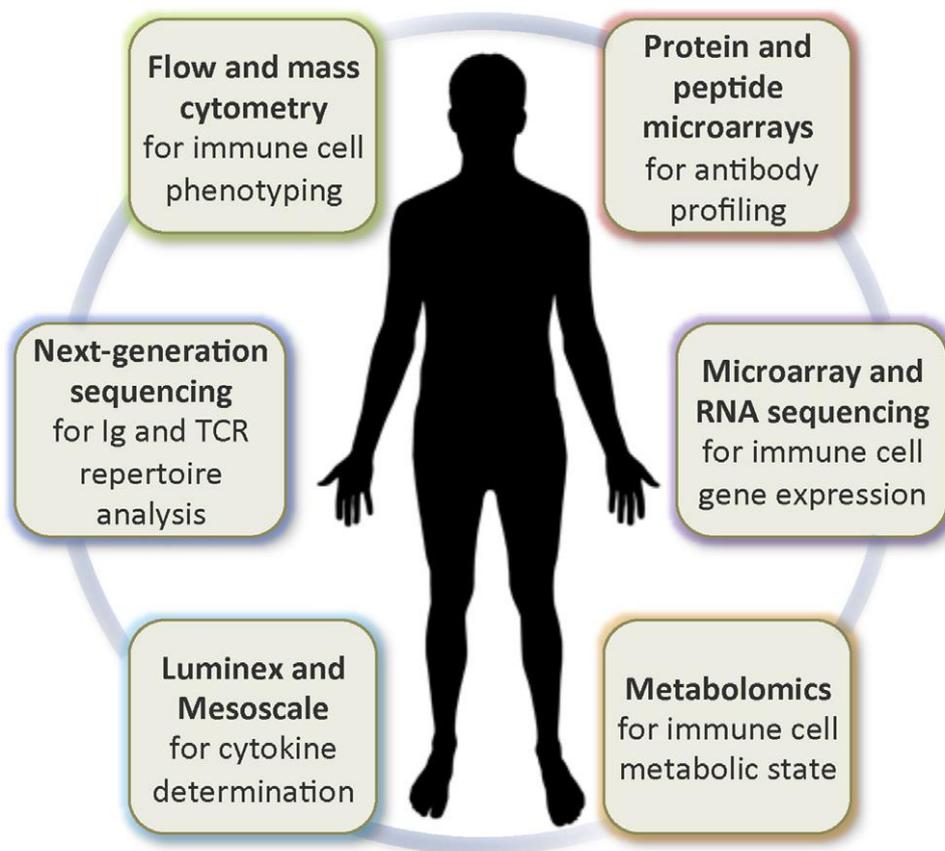


Figura 2. Representa las herramientas de alto rendimiento en el estudio del sistema inmunológico humano, que permiten una mayor comprensión de la respuesta inmune a la vacunación⁶².

La inmunidad pasiva es la que adquiere un individuo al recibir, de forma natural (durante el embarazo) o artificial, los anticuerpos producidos por un sujeto donante, los cuales son capaces de reaccionar específicamente contra un agente ya reconocido como extraño por dicho donante. Este tipo de inmunidad

⁶² Furman, D., & Davis, MM (2015). Nuevos enfoques para la comprensión de la respuesta inmune a la vacunación y la infección. *Vacuna*, 33 (40), 5271 hasta 5281. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.117>.

es de corta duración. La inmunidad adoptiva se adquiere al recibir de un donante las células, generalmente linfocitos T, capaces de reconocer y de responder específicamente a un agente extraño⁶³.

1.2.1 Componentes de las vacunas

Actualmente no solo existen vacunas contra las enfermedades infecciosas provocadas por microorganismos patógenos, sino que como se ha comentado, se cuenta con vacunas contra algunas enfermedades alérgicas; por su composición todas las vacunas constan de un antígeno (péptido, polisacárido o lípido), capaz de inducir una respuesta inmune al ser reconocido por los receptores de células B y células T dando lugar a una respuesta de anticuerpos y células T específicos de antígeno (ver figura 3); estas moléculas pueden ser parte de un microorganismo patógeno exógeno (por ejemplo, virus, bacteria o levadura) o parte del mismo huésped (por ejemplo, moléculas resultantes de inflamación o de células cancerosas); hoy en día, la preparación que constituye el compuesto inmunológico (vacuna) surge a partir de microorganismos vivos atenuados o inactivos, o de sus productos inactivados, capaces de proteger a corto, medio o largo plazo contra ciertas enfermedades⁶⁴. Con el fin de aumentar la estabilidad y fortalecer su potencia, las vacunas también poseen otros constituyentes (ver figura 4), como el líquido para la suspensión (suero salino, polímeros solubles en agua, micelas geles), compuestos preservativos (formaldehído), estabilizadores (sulfato de magnesio y lactosa sorbitol),

⁶³ Rugeles MT, Patiño PJ, Montoya CJ. Inmunología, una ciencia activa. 2ª ed. Medellín: Universidad de Antioquia; 2009.

⁶⁴ Mužíková G, Laga R. Macromolecular systems for vaccine delivery. *Physiol Res.* 2016 Oct 20;65(Supplementum 2):p203-p216

antibióticos y adyuvantes (hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, alumbre o sales de aluminio mixto). Estos últimos definidos como “sustancias añadidas a algunas vacunas para potenciar la respuesta inmune de los individuos vacunados”⁶⁵.

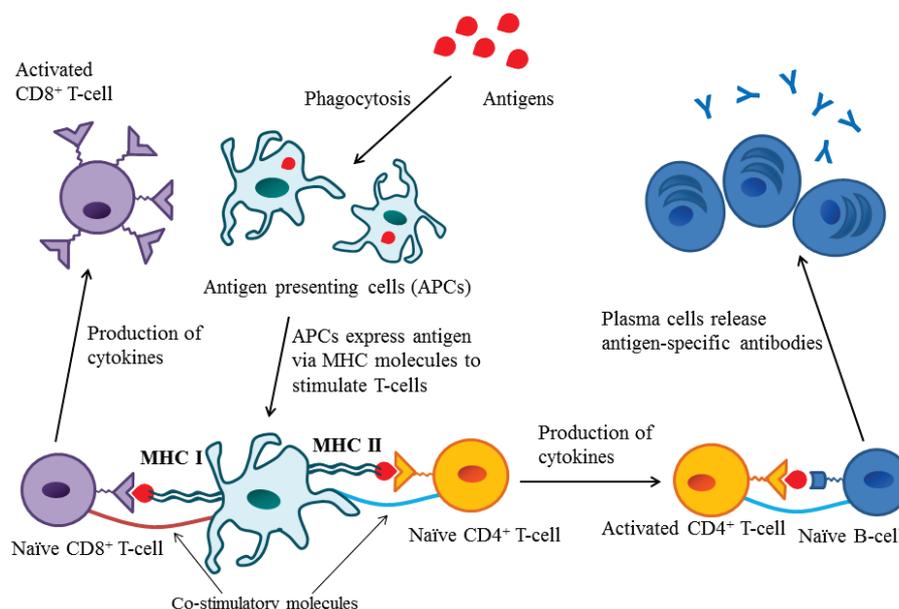


Figura 3. Esquema de inducción de inmunidad adaptativa⁶⁶. El antígeno es tomado y procesado por la célula dendrítica (célula presentadora de antígeno), posteriormente presentado (un fragmento del antígeno) a las células T, vía moléculas de MHC II o MHC I. Las células T CD4 + vírgenes (*naïve*) reconocen el complejo MHC II / proteína antigénica, activándose y se unen a células plasmáticas que crean células B que liberan anticuerpos específicos de epítomos. Las células T CD8 + vírgenes se activan uniéndose al complejo proteína MHC I / antígeno, presentado en las CPA y maduran para convertirse en células T citotóxicas activadas que reconocen específicamente los epítomos antigénicos. Ambos mecanismos son importantes para la formación de inmunidad adaptativa.

⁶⁵U.S. FOOD & DRUG [Internet]. [citado el 21 de mayo de 2017]. Disponible en: <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/VaccineSafety/ucm187810.htm>.

⁶⁶Mužíková G., op. cit.; p.205.

1.2.2 Alergoides

A través de procesos de estandarización biológica, se va mejorando la calidad de los extractos alérgicos consiguiendo extractos más puros y potentes, que pueden ser responsables, no obstante, de un mayor número de reacciones adversas. Con el propósito de reducir los efectos adversos se buscan alternativas⁶⁷.

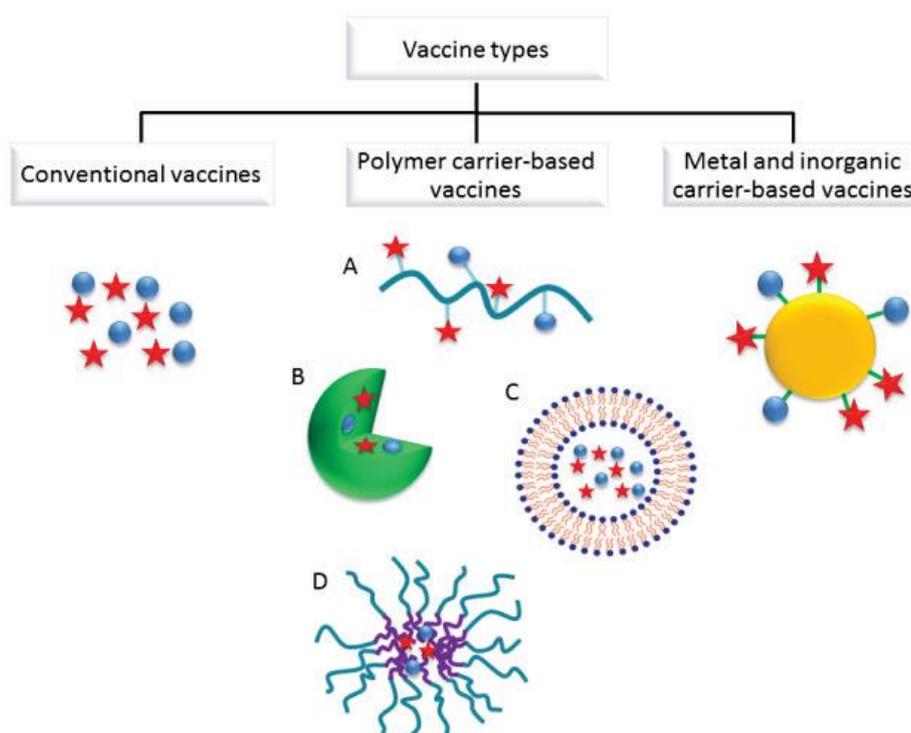


Figura 4. Representación esquemática de los tipos de vacunas. (A) Vehículo polimérico hidrofílico lineal, (B) (nano) partícula, (C) liposoma, (D) micela de polímero⁶⁸.

⁶⁷Mosbech H, Dreborg S, Frolund L, Ljungstedt Pahlman I, Svendsen UG, Sborg M, y cols. Hyposensitization in asthmatics with mPEG modified and unmodified house dust mite extract. II. Effect evaluated by challenges with allergen and histamine. *Allergy*. 1989; 44(7):499-509.

⁶⁸Mužíková G., op. cit.; p.204.

Los alérgoides son alérgenos purificados y modificados con una estructura proteica modificada⁶⁹. Esto se consigue manipulando químicamente la estructura externa de los alérgenos nativos, por ejemplo por polimerización con glutaraldehído o formaldehído, debilitando su potencia alérgica, pero conservando sus propiedades inmunológicas. Al comparar el alérgoide con el alérgeno nativo, en el primero se producirá una reacción alérgica menos pronunciada, debido a que los sitios de unión a IgE se vuelven inactivos secundario a su estructura química alterada.

La despigmentación también es usada para modificar los extractos. Patterson (1981)⁷⁰ refirió que la eficacia clínica de los extractos alérgicos modificados ha demostrado ser prácticamente igual a los alérgenos nativos, pero con la diferencia de que en el alérgoide su alergenidad es 1.000 veces menor.

En 2007 Casanovas y cols., indicaron que la inmunoterapia específica con alérgenos despigmentados y polimerizados, estos son fiables en el tratamiento de la rinoconjuntivitis y/o asma⁷¹.

⁶⁹Grammer LC, Shaughnessy MA, Finkle SM, Shaughnessy JJ, Patterson R. A double-blind placebo-controlled trial of polymerized whole grass administered in an accelerated dosage schedule for immunotherapy of grass pollenosis. *J Allergy Clin Immunol.* 1986 Dec; 78(6):1180-4. Pastorello EA, Pravettoni V, Incorvaia C, Mambretti M, Franck E, Wahl R, Zanussi C. Clinical and immunological effects of immunotherapy with alum-absorbed grass allergoid in grass-pollen-induced hay fever. *Allergy.* 1992 Aug; 47(4 Pt 1):281-90.

Mösges R, Ritter B, Kayoko G, Allekotte S. Carbamylated monomeric allergoids as a therapeutic option for sublingual immunotherapy of dust mite- and grass pollen-induced allergic rhinoconjunctivitis: a systematic review of published trials with a meta-analysis of treatment using Lais® tablets. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2010 Oct; 19(3):3-10.

⁷⁰Patterson R, Suszko IM, Zeiss CR, Pruzansky JJ. Development and evaluation of polymerized allergens for immunotherapy. *Int Arch Allergy App Immunol.* 1981;66 Suppl 1:293-6.

⁷¹Casanovas M, Martín R, Jiménez C, Caballero R, Fernández-Caldas E. Safety of immunotherapy with therapeutic vaccines containing depigmented and polymerized allergen extracts. *Clin Exp Allergy.* 2007 Mar; 37(3):434-40.

Guardia y Moreno⁷² hacen referencia a que “las vacunas antialérgicas proceden de materia prima obtenida de la naturaleza (pólenes, hongos, venenos de insectos, látex, etc.)”. Según Parra, el material empleado para hacer la mayoría de pruebas alérgicas es el extracto alergénico. Para su obtención la sustancia natural se fragmenta, se diluye en solventes específicos, se filtra, se purifican las proteínas y posteriormente se esterilizan. El resultado final es un extracto rico en proteínas que se empleará para la realización de las pruebas alérgicas y tratamientos con vacunas⁷³.

1.3 Mecanismo de acción de la inmunoterapia

En relación a la definición de la alergia, Chivato refiere:

“La alergia es una respuesta exagerada (reacción de hipersensibilidad) del sistema defensivo (sistema inmunitario) del paciente, que identifica como nocivas determinadas sustancias inocuas (como pueden ser los pólenes de algunas plantas, o los ácaros del polvo doméstico, por ejemplo) habitualmente toleradas por la mayoría de personas. Esta respuesta inapropiada y equivocada, en lugar de ser *beneficiosa*, es claramente *perjudicial* para el paciente y produce una serie de alteraciones inflamatorias de la piel y las mucosas, que originan los diferentes síntomas y signos de las enfermedades alérgicas”⁷⁴.

⁷²Guardia P, Moreno C. Las vacunas contra la alergia o inmunoterapia. En: Zubeldia J.M, Baeza M. L, Jáuregui I, Senent J. Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA [Internet] Bilbao: Fundación BBVA; 2012. [citado el 21 de mayo de 2017]. p. 448. Disponible en: <http://alergiafbbva.es/el-tratamiento-de-las-enfermedades-alergicas/52-las-vacunas-contra-la-alergia-o-inmunoterapia/#>.

⁷³Parra Arrondo A. Las pruebas en la piel. En: Zubeldia J.M, Baeza M. L, Jáuregui I, Senent J. Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA [Internet] Bilbao: Fundación BBVA; 2012. [citado el 21 de mayo de 2017]. p. 365. Disponible en: <http://alergiafbbva.es/el-tratamiento-de-las-enfermedades-alergicas/52-las-vacunas-contra-la-alergia-o-inmunoterapia/#>

⁷⁴Chivato Pérez T. ¿Qué es la alergia? ¿Qué estudia la Alergología?. En: Zubeldia J.M, Baeza M. L, Jáuregui I, Senent J. Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA [Internet]

La exposición de un paciente con alergia respiratoria al alérgeno al que se encuentra sensibilizado induce una respuesta inmune inapropiada, con producción de citocinas Th2 y de IgE, reclutamiento y activación de basófilos, eosinófilos y mastocitos en mucosa nasal/oral⁷⁵. Con el fin de dar solución a este problema se ha empleado la inmunoterapia, fundamentada en los múltiples estudios hasta ahora realizados, con el fin de redireccionar la respuesta inmune inapropiada^{76,77}

Esquemáticamente, se describen 3 tipos de cambios inmunológicos inducidos por la inmunoterapia: 1) modulación de las respuestas de anticuerpos específicos de alérgeno; 2) reducción en el reclutamiento y la activación de células proinflamatorias, y 3) los cambios en el patrón de respuestas de linfocitos T específicos⁷⁸.

Bilbao: Fundación BBVA; 2012. [citado el 21 de mayo de 2017]. p. 21-22. Disponible en: <http://alergiafbbva.es/el-tratamiento-de-las-enfermedades-alergicas/52-las-vacunas-contra-la-alergia-o-inmunoterapia/#>

⁷⁵Moingeon P, Batard T, Fadel R, Frati F, Sieber J, Overtvelt L. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy* 2006; 61:151-65.

O'Hehir RE, Sandrini A, Anderson GP, Rolland JM. Sublingual allergen immunotherapy: immunological mechanisms and prospects for refined vaccine preparation. *Curr Med Chem* 2007; 14:2235-44.

Scadding G, Durham S. Mechanisms of sublingual immunotherapy. *J Asthma* 2009; 46:322-34.

Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:18-27.

Bahceciler NN, Galip N. Comparing subcutaneous and sublingual immunotherapy: what do we know? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012; 12:640-7.

⁷⁶Calderon MA, Simons FE, Malling HJ, Lockey RF, Moingeon P, Demoly P. Sublingual allergen immunotherapy: mode of action and its relationship with the safety profile. *Allergy* 2012; 67:302-11.

⁷⁷Allam JP, Novak N. Local immunological mechanisms of sublingual immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011; 11:571-8.

⁷⁸Moingeon P, Batard T, Fadel R, Frati F, Sieber J, Overtvelt L. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy* 2006; 61:151-65.

1.3.1 Células Presentadoras de Antígenos (CPA) y sus receptores

Las CPA constituyen un grupo de células especializadas, cuyo objeto es capturar, endocitar, procesar y presentar péptidos antigénicos en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II al receptor antigénico (TCR) de los linfocitos T CD4+. Una vez activadas expresan o producen otras moléculas, denominadas coestimuladoras, que son necesarias para una adecuada activación de los linfocitos T⁷⁹. Entre otros, las CPA se encuentran en la mucosa oral, que es una unidad inmunológica única en continuo contacto con alérgenos nativos y el tracto gastrointestinal, en el que la tolerancia inmune suele ser el resultado del contacto con alérgenos. Las CPA desempeñan un papel importante en la respuesta inmune inicial dependiente del alérgeno, no solo en la piel sino también en la mucosa oral⁸⁰.

Las células presentadoras de antígenos orales (CPAo) comprenden 3 subtipos de células dendríticas (CD) con diferente distribución tisular: 1) células de Langerhans (CL), localizadas en el propio epitelio oral; 2) una subpoblación de células dendríticas mieloides (CDm), así como células similares a los macrófagos ubicadas a lo largo de la lámina propia y 3) células dendríticas plasmocitoides (CDp) que se encuentran en el tejido subepitelial⁸¹.

⁷⁹Rugeles T, y otros. *Inmunología una ciencia activa*. Univ. de Antioquía 2009; 2ª ed. pag. 670.

⁸⁰Allam JP, Novak N, Fuchs C, Asen S, Berge S, Appel T et al. Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive FcεpsilonRI expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:141–148.

⁸¹Allam JP, Duan Y, Winter J, Stojanovski G, Fronhoffs F, Wenghoefer M, et al. Tolerogenic T cells, Th1/Th17 cytokines and TLR2/TLR4 expressing dendritic cells predominate the microenvironment within distinct oral mucosal sites. *Allergy* 2011; 66:532-9.

Mascarell L, Lombardi V, Louise A, Saint-Lu N, Chabre H, Moussu H, et al. Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:603-9.

Ibid. Allam JP, Novak N.

Las células dendríticas orales (CDo) poseen las siguientes características: 1) expresan en su superficie de forma constitutiva receptores de alta afinidad para IgE (FcεRI), 2) presentan receptores para IgG (Fcγ), 3) expresan un aumento de la expresión de los complejos de MHC clase I y II y moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 / B7.1 y CD86 / B7.2) y 4), que poseen actividad estimuladora⁸². Además, este tipo de células de la mucosa oral son fundamentalmente tolerogénicas a diferencia de las ubicadas en otros territorios⁸³(Véase la tabla 2).

Todas estas CPA tienen capacidad de captación de antígenos/alérgenos por fagocitosis, macropinocitosis, o endocitosis mediada por receptores⁸⁴.

Como se mencionó anteriormente en el ser humano, las CDo expresan constitutivamente FcεRI, lo que podría permitir a las CDo capturar a los alérgenos de una manera específica a través de IgE unida al FcεRI en la superficie celular. Este receptor se ha detectado en la superficie de las CDo de individuos alérgicos y su expresión, como su ocupación por la IgE, se correlaciona con los niveles séricos de IgE⁸⁵.

Mascarell L, Saint-Lu N, Moussu H, Zimmer A, Louise A, Lone Y, et al. Oral macrophage-like cells play a key role in tolerance induction following sublingual immunotherapy of asthmatic mice. *Mucosal Immunol* 2011; 4: 638-47.

⁸²Ibid. Allam JP, Novak N.

⁸³Novak N, Bieber T, Allam J-P. Immunological mechanisms of sublingual allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 2011; 66: 733–739.

⁸⁴Mascarell L, Saint-Lu N, Moussu H, Zimmer A, Louise A, Lone Y, et al. Oral macrophage-like cells play a key role in tolerance induction following sublingual immunotherapy of asthmatic mice. *Mucosal Immunol* 2011; 4: 638-47).

Mascarell L, Lombardi V, Louise A, Saint-Lu N, Chabre H, Moussu H, et al. Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4⁺ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:603-9.

⁸⁵Allam JP, Novak N, Fuchs C, Asen S, Bergé S, Appel T, Geiger E, Kochan JP, Bieber T. Character of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive FcεRI expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Jul;112(1):141-8

Allam y cols., demostraron la expresión constitutiva de FcεRI en células de Langerhans orales (CLO), con una correlación positiva entre la expresión de FcεRI y los niveles séricos de IgE en individuos atópicos, aunque no en individuos sanos⁸⁶.

En otro estudio, los autores demostraron que cuando se comparan las CDo con sus homólogas en piel sana, las CDo expresan constitutivamente FcεRI (CD16, CD32 y CD64) en cantidad elevada, incluso en donantes no atópicos, además de cantidades significativas de MHC de clases I y II, así como las moléculas coestimuladoras CD40, CD80/B7.1 y CD86/B7.2, y los receptores para IgG, FcγRIII/CD16 y FcγRI/CD64⁸⁷.

Se ha encontrado, asimismo, que las CLo de donantes alérgicos y no alérgicos no difieren mucho en la capacidad de capturar alérgenos, lo que lleva a concluir que no solo está implicado el FcεRI, sino que en la absorción de alérgenos en la ITSL participan otros receptores, como las lectinas (aunque esto está discutido)⁸⁸.

Durante la administración de ITSL, el alérgeno es capturado por células dendríticas inmaduras que residen en la mucosa oral, las cuales expresan receptores de membrana de tipo Toll (TLR) 2 o TLR4 que se unen al antígeno,

Allam JP, Niederhagen B, Bucheler M, Appel T, Betten H, Bieber T et al. Comparative analysis of nasal and oral mucosa dendritic cells. *Allergy* 2006; 61:166–172.

⁸⁶Ibid. Allam JP, Novak N.

⁸⁷Ibid.

⁸⁸Larche M. Immune mechanisms of sublingual immunotherapy: are oral Langerhans cells the masters of tolerance? *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:646–647.

lo captan mediante endocitosis y procesan la proteína en péptidos capaces de unirse a las moléculas del MHC⁸⁹.

Tabla 2. Comparación entre células de Langerhans (CL) epidérmicas y células de Langerhans oral.

	CL de la Epidermis de la piel	CL de la mucosa oral
CD1a	+++	++
MHC II	++	+++
FcεRI	(-/+)	+++
Langerin/CD207	+++	++
CD83	Sin diferencia	Sin diferencia
TLR2	(-/+)	++
TLR4	(-/+)	++
CD14	(-/+)	++

CL: células de Langerhans; TLR: receptor de tipo Toll; FcεRI: receptor para IgE de alta afinidad; MHC: Complejo Principal de Histocompatibilidad⁹⁰.

Tras la estimulación a través de TLR4, las CL humanas de la mucosa oral inducen una fuerte producción de IFN-γ e IL-10 por linfocitos T CD4⁺⁹¹, lo que

⁸⁹Allam JP, Duan Y, Winter J, Stojanovski G, Fronhoffs F, Wenghoefer M et al. Tolerogenic T cells, Th1/Th17 cytokines and TLR2/TLR4 expressing dendritic cells predominate the microenvironment within distinct oral mucosal sites. *Allergy* 2010; 10-9995.

⁹⁰N. NOVAK, T. BIEBER & J.-P. ALLAM. IMMUNOLOGICAL MECHANISMS OF SUBLINGUAL ALLERGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY. *ALLERGY*. 2011 JUN; 66(6):733-9. DOI: 10.1111/J.1398-9995.2010.02535.x. EPUB 2011 JAN 20.

⁹¹Allam JP, Peng WM, Appel T, Wenghoefer M, Niederhagen B, Bieber T et al. Toll-like receptor 4 ligation enforces tolerogenic properties of oral mucosal Langerhans cells. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121: 368–374.

refleja que la estimulación a través del TLR4 potencia las respuestas Th1/Treg siendo una característica general compartida por todos los subtipos de CD.⁹²

Parece posible que el contacto del alérgeno con la mucosa oral sea crítico para el éxito de la ITSL⁹³. Se postula que lo más probable es que las células de Langerhans orales estén críticamente involucradas en el proceso.⁹⁴

Estudios realizados ex vivo en tejido de mucosa oral aislada de humanos, en los que se empleó el alérgeno Phl p 5 de la gramínea *Phleum pratense* marcado con fluorescencia, revelaron que la capacidad de las LCo para capturar los alérgenos alcanzaba el umbral después de: a) un tiempo definido de contacto y b) una concentración específica del alérgeno. La unión del alérgeno a las LCo hace que

⁹²Allam JP, Duan Y, Winter J, Stojanovski G, Fronhoffs F, Wenghoefer M, et al. Tolerogenic T cells, Th1/Th17 cytokines and TLR2/TLR4 expressing dendritic cells predominate the microenvironment within distinct oral mucosal sites. *Allergy* 2011; 66:532-9.

Mascarell L, Lombardi V, Louise A, Saint-Lu N, Chabre H, Moussu H, et al. Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:603-9.

Allam JP, Novak N, Fuchs C, Asen S, Berge S, Appel T, et al. Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans cell type with high constitutive FcεRI expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:141-8.

Mascarell L, Saint-Lu N, Moussu H, Zimmer A, Louise A, Lone Y, et al. Oral macrophage-like cells play a key role in tolerance induction following sublingual immunotherapy of asthmatic mice. *Mucosal Immunol* 2011;4:638-47.

Razafindratsita A, Saint-Lu N, Mascarell L, Berjont N, Bardon T, Betbeder D, et al. Improvement of sublingual immunotherapy efficacy with a mucoadhesive allergen formulation. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:278-85.

Saint Lu N, Tourdot S, Razafindratsita A, Mascarell L, Berjont N, Chabre H, et al. Targeting the allergen to oral dendritic cells with mucoadhesive chitosan particles enhances tolerance induction. *Allergy* 2009; 64:1003-13.

Allam JP, Wurtzen PA, Reinartz M, Winter J, Vrtala S, Chen KW, et al. Phl p5 resorption in human oral mucosa leads to dose dependent and time dependent allergen binding by oral mucosal Langerhans cells, attenuates their maturation and enhances their migratory and TGFβ1 and IL10 producing properties. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:638-45.

Allam JP, Peng WM, Appel T, Wenghoefer M, Niederhagen B, Bieber T, et al. Toll-like receptor 4 ligation enforces tolerogenic properties of oral mucosal Langerhans cells. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:368-74. Larché M. Immune mechanisms of sublingual immunotherapy: are oral Langerhans cells the masters of tolerance? *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:646-7.

⁹³ Passalacqua G, Albano M, Fregonese L, Riccio A, Pronzato C, Mela GS, et al. Randomized controlled trial of local allergoid immunotherapy on allergic inflammation in mite-induced rhinoconjunctivitis. *Lancet* 1998; 351:629-32

⁹⁴Allam JP, Niederhagen B, Bucheler M, Appel T, Betten H, Bieber T, et al. Comparative analysis of nasal and oral mucosa dendritic cells. *Allergy* 2006; 61:166-72.

se produzcan IL-10 y TGF B1, además de aumentar su capacidad de emigrar, si bien atenúa su maduración⁹⁵.

Los estudios de Steinman y cols., han avalado lo anteriormente citado: la desaceleración en la maduración de LCo que han capturado Phl p 5 destaca sus propiedades tolerogénicas, ya que se ha demostrado que las DC inmaduras y semimaduras inducen preferentemente tolerancia⁹⁶. Lo que permite concluir, según Novak, que la migración de LCo inmaduras podría ser un sello distintivo de las CD de las mucosas. En este sentido, el microambiente en la mucosa oral podría desempeñar un papel fundamental, ya que representa un lugar de preferencia tolerogénico, lo que podría preservar el fenotipo inmaduro de las LCo a través de factores solubles, tales como TGF- β 1⁹⁷.

En la inducción de la tolerancia específica de alérgeno por vía sublingual los alérgenos son capturados y procesados por las células presentadoras de antígenos orales (CL, CDm; macrófagos) entre los 15 y 30 minutos. Esas CPA viajan con el péptido derivado del alérgeno hacia los ganglios linfáticos locales y cervicales entre las 12 y 24 horas, donde interactúan los linfocitos T CD4+ vírgenes e inducen linfocitos Th1 y linfocitos T reguladores (Treg) con actividad supresora entre 2 y 5 días. Los linfocitos T CD4+ migrarán posteriormente a la

⁹⁵Allam JP, Wurtzen PA, Reinartz M, Winter J, Vrtala S, Chen KW et al. Phl p 5 resorption in human oral mucosa leads to dose dependent and time-dependent allergen binding by oral mucosal Langerhans cells, attenuates their maturation, and enhances their migratory and TGF-beta1 and IL-10-producing properties. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:638–645.)

⁹⁶Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:685-711. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002;23:445-9 .

⁹⁷Novak N, Haberstok J, Bieber T, Allam JP. The immune privilege of the oral mucosa. *Trends Mol Med* 2008;14:191-8. Allam JP, Klein E, Bieber T, Novak N. Transforming growth factor-beta1 regulates the expression of the high-affinity receptor for IgE on CD34 stem cell-derived CD1a dendritic cells in vitro. *J Invest Dermatol* 2004;123:676-82.

sangre y a los tejidos dando lugar a una tolerancia específica de alérgeno a largo plazo⁹⁸. Se ha comunicado que los LCo y los linfocitos T se co-localizan en las crestas epiteliales y en la lámina propia de la mucosa oral^{99,100}.

1.3.2 Respuestas de los linfocitos T y sus receptores

En los ratones se detectan escasas células linfáticas (linfocitos B, linfocitos T CD8+, linfocitos T NK), con la excepción de los linfocitos T CD4+, de las cuales el 50% expresan el marcador de asentamiento (*homing*) en mucosas, CD103¹⁰¹. En el sistema inmune oral humano, Allam y cols., destacan la presencia de abundantes linfocitos T CD4+ frente a los linfocitos CD8+. Esos linfocitos T se localizan a lo largo de la lámina propia, próximos a numerosas CPA e incluyen tanto células CD4+ reguladoras como efectoras (Th1, Th2 o Th17), que probablemente intervienen en la defensa frente a patógenos¹⁰². La hipótesis anterior es consistente con la observación de pacientes con déficit de linfocitos Th17 en mucosa oral, que presentan elevada susceptibilidad a padecer infección

⁹⁸Moingeon P. Update on immune mechanisms associated with sublingual immunotherapy: practical implications for the clinician. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2013 May-Jun; 1(3):228-41.

⁹⁹Allam JP, Stojanovski G, Friedrichs N, Peng W, Bieber T, Wenzel J, y cols. Distribution of Langerhans cells and mast cells within the human oral mucosa: new application sites of allergens in sublingual immunotherapy? *Allergy* 2008; 63: 720-7.

Jotwani R, Palucka AK, Al-Quotub M, Nouri-Shirazi M, Kim J, Bell D, y cols. Mature dendritic cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic periodontitis: in situ, in vivo, and in vitro studies. *J Immunol* 2001; 167:4693-700.

¹⁰⁰Jotwani R, Palucka AK, Al-Quotub M, Nouri-Shirazi M, Kim J, Bell D y cols. Mature dendritic cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic periodontitis: in situ, in vivo, and in vitro studies. *J Immunol* 2001; 167:4693-4700.

¹⁰¹Mascarell L, Lombardi V, Zimmer A, Louise A, Tourdot S, Van Overtvelt L, et al. Mapping of the lingual immune system reveals the presence of both regulatory and effector CD4⁺ T cells. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1910-9.

¹⁰²Allam JP, Duan Y, Winter J, Stojanovski G, Fronhoffs F, Wenghoefer M, et al. Tolerogenic T cells, Th1/Th17 cytokines and TLR2/TLR4 expressing dendritic cells predominate the microenvironment within distinct oral mucosal sites. *Allergy* 2011;66:532-9

por *Candida Albicans*¹⁰³. Moingeon y cols indicaron que los linfocitos Treg y Th1 diferenciados a partir de linfocitos T vírgenes (*naïve*) en los órganos linfáticos orales pasan a desempeñar un papel muy importante en la tolerancia inducida por la administración de ITSL¹⁰⁴.

Continuando con la respuesta a la inmunoterapia con alérgenos, los linfocitos Treg se encargan de modular la respuesta de los linfocitos T CD4+, tal vez para restablecer el equilibrio Th1/Th2¹⁰⁵. Los linfocitos Treg son linfocitos T CD4+CD25+ que secretan IL-10 y TGF- β y que se dividen en 2 subtipos: linfocitos Tr1, con predominio de producción de IL-10 y linfocitos Th3, que producen predominantemente TGF- β ¹⁰⁶.

Los anteriores hallazgos fueron confirmados en el estudio *in vitro* realizado por Mascarell y cols, quienes encontraron que las CD orales/linguales desempeñaban un papel en la inducción de tolerancia, polarizando la respuesta de linfocitos T CD4+ hacia Th1, e induciendo, además, la secreción de IL-10 por

¹⁰³Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindermann MJ, et al. Th17 cells and IL17 receptor signalling are essential for mucosal host defence against oral candidiasis. *J Exp Med* 2009;206:299-311

¹⁰⁴Moingeon P. Update on immune mechanisms associated with sublingual immunotherapy: Practical implications for the clinician. *J Allergy Clin Immunol: In Practice* 2013;1:228-41.

¹⁰⁵(Moingeon P, Batard T, Fadel R, Frati F, Sieber J, Overtvelt L. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy* 2006; 61:151-65.

O'Hehir RE, Sandrini A, Anderson GP, Rolland JM. Sublingual allergen immunotherapy: immunological mechanisms and prospects for refined vaccine preparation. *Curr Med Chem* 2007; 14:2235-44.

Scadding G, Durham S. Mechanisms of sublingual immunotherapy. *J Asthma* 2009; 46:322-34.

Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:18-27.

Bahceciler NN, Galip N. Comparing subcutaneous and sublingual immunotherapy: what do we know? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012;12:640-7

¹⁰⁶Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta- secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182:207-14.

Groux H, O'Garra A, Bigler M et al. A CD41 T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389:737-42.

linfocitos Treg¹⁰⁷; según Bohle y cols., una ITSL eficaz induce la secreción de IL-10 por las células Treg, estando los diferentes mecanismos inmunitarios operativos durante las fases temprana y tardía del tratamiento¹⁰⁸; por su parte, Cosmi y cols., encontraron que la ITSL aumentaba la producción de IL-10- e IFN- γ por los linfocitos T y producía una disminución de la IgE específica¹⁰⁹.

Además de la importancia de los linfocitos T en la ITSL, los TRL contribuyen a la conservación de la homeostasis, lo que queda demostrado por los siguientes estudios: la estimulación *in vitro* de las CD orales con ligandos de TRL induce mecanismos pro-tolerogénicos, tales como una sobrerregulación de la expresión de moléculas coinhibitorias (B7H1 y B7H3) o la liberación de IL-10 y un incremento de linfocitos T FoxP3 productores de IL-10 y linfocitos T productores de TGF- β ¹¹⁰ *in vivo*, que puede contribuir al mantenimiento de la homeostasis inmune a pesar de la frecuente estimulación de CD por antígenos microbianos¹¹¹. Comparando el microambiente y la presencia de citocinas pro-tolerogénicas en la mucosa oral y la piel, la expresión del mRNA de IL-10 y TGF- β es elevada en

¹⁰⁷Mascarell L, Saint-Lu N, Moussu H, Zimmer A, Louise A, Lone Y, y cols. Oral macrophage-like cells play a key role in tolerance induction following sublingual immunotherapy of asthmatic mice. *Mucosal Immunol* 2011; 4: 638-47.

Mascarell L, Lombardi V, Louise A, Saint-Lu N, Chabre H, Moussu H, y cols. Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:603-9.

¹⁰⁸Bohle B, Kinaciyan T, Gerstmayr M, Radakovics A, Jahn-Schmid B, Ebner C. Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:707-13.

¹⁰⁹Cosmi L, Santarasci V, Angeli R, Liotta F, Maggi L, Frosali F, et al. Sublingual immunotherapy with Dermatophagoides monomeric allergoid down-regulates allergen-specific immunoglobulin E and increases both interferon- γ - and interleukin-10-production. *Clin Exp Allergy* 2006; 36:261-72. Fujimura T, Yonekura S, Horiguchi S, Taniguchi Y, Saito A, Yasueda H, y cols. Increase of regulatory T cells and the ratio of specific IgE to total IgE are candidates for response monitoring or prognostic biomarkers in 2-year sublingual immunotherapy (SLIT) for Japanese cedar pollinosis. *Clin Immunol* 2011; 139:65-74.

¹¹⁰Allam JP, Peng WM, Appel T, Wenghoefer M, Niederhagen B, Bieber T et al. Toll-like receptor 4 ligation enforces tolerogenic properties of oral mucosal Langerhans cells. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:368-374.

¹¹¹Ibid.

todas las regiones de la mucosa oral y el porcentaje de linfocitos T productores de IL-10 y TGF- β está aumentado. Adicionalmente, la expresión de interferón-gamma (INF- γ) es más elevada en la mucosa oral que en la piel¹¹².

Las células de Langerhans humanas, que han demostrado *in vitro* ser eficientes en la captura de alérgenos, expresan constitutivamente receptores de alta afinidad para IgE, probablemente contribuyendo a la captura del alérgeno mediada por esta inmunoglobulina. La activación de estos receptores por los complejos IgE-alérgeno incrementa la secreción de IL-10 y TGF- β , así como expresión de indolamina-2-dioxigenasa, poniendo de manifiesto así el fenotipo tolerogénico de las células¹¹³.

Durante la inmunoterapia específica con polen se produce un cambio en la mucosa local del predominio de citocinas del tipo Th2 al Th1 y una disminución de los niveles de IL-5 y de la eosinofilia¹¹⁴, en el que la IL-12 tiene mucho que ver con el cambio.

El estudio realizado por Winkler y cols (2006) en un modelo murino de alergia al polen de abedul, indicó que la vacunación por vía de la mucosa es útil para

¹¹²Allam JP, Duan Y, Winter J, Stojanovski G, Fronhoffs F, Wenghoefer M et al. Tolerogenic T cells, Th1/Th17 cytokines and TLR2/TLR4 expressing dendritic cells predominate the microenvironment within distinct oral mucosal sites. *Allergy* 2010; 10-9995

¹¹³Allam JP, Novak N, Fuchs C, Asen S, Berge S, Appel T, et al. Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans cell type with high constitutive Fc ϵ R1 expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:141-8.)(Allam JP, Wurtzen PA, Reinartz M, Winter J, Vrtala S, Chen KW, et al. Phl p 5 resorption in human oral mucosa leads to dose dependent and time dependent allergen binding by oral mucosal Langerhans cells, attenuates their maturation and enhances their migratory and TGF β 1 and IL10 producing properties. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:638-45)

¹¹⁴Durham SR, Sun Ying, Varney VA et al. Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD41 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.

inducir tolerancia en la propia mucosa. Posterior a la aplicación intranasal de Bet v 1 (el principal alérgeno del polen de abedul), o de un fragmento hipoalérgénico (derivado del alérgeno principal), al analizar los esplenocitos arrojaron los siguientes resultados: la inducción de tolerancia con el alérgeno principal se asoció con una mayor expresión de TGF- β , IL-10 y RNAm de Foxp3 en las células T CD4+, mientras que el tratamiento con el fragmento condujo a la inducción de Foxp3 (si era profilaxis) o IL-10 (si era terapia). Concluyendo a partir de esos datos (i) que los mecanismos subyacentes a la tolerancia periférica están vinculados a la conformación del antígeno, (ii) que la tolerancia de la mucosa está mediada por subconjuntos de células reguladoras separadas, y (iii) que la eficacia a largo plazo de la inmunosupresión está asociada con la presencia de células T Foxp3+¹¹⁵. Adicionalmente, Mascarell y cols¹¹⁶ en su estudio del 2009 realizado en ratones, en relación a la vía sublingual, refieren que esta vía es pertinente para inducir la tolerancia específica del antígeno, secundario a: el número limitado de células proinflamatorias, localizadas más en el tejido submucoso y a la co-localización de CPA y células T CD4+ con funciones reguladoras.

Precisa, entonces, colegir de lo anterior, que los mecanismos de la inmunoterapia abarcan la inducción de una respuesta de células Treg^{117,118},

¹¹⁵Winkler B, Hufnagl K, Spittler A, Ploder M, Kallay E, Vrtala S et al. The role of Foxp3+ T cells in long-term efficacy of prophylactic and therapeutic mucosal tolerance induction in mice. *Allergy* 2006; 61:173–180.

¹¹⁶Mascarell L, Lombardi V, Zimmer A, Louise A, Tourdot S, Van Overtvelt L, Moingeon P. Mapping of the lingual immune system reveals the presence of both regulatory and effector CD4+ T cells. *Clin Exp Allergy*. 2009 Dec; 39(12):1910-9.

¹¹⁷Scadding GW, Shamji MH, Jacobson MR, Lee DI, Wilson D, Lima MT, et al. Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B cells. *Clin Exp Allergy* 2010; 40:598-606.

¹¹⁸Durham SR, Emminger W, Kapp A, de Monchy JG, Rak S, Scadding GK, et al. SQ-standardized sublingual grass immunotherapy: confirmation of disease modification 2 years after 3 years of treatment in a randomized trial. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:717-26.

además de un cambio de patrón Th2 a Th1¹¹⁹, sugiriendo la inducción de vías tolerogénicas^{120,121,122}

1.3.3 Efectos sobre la respuesta de anticuerpos específicos de alérgeno

Los efectos de la ITSL no solo se traducen en cambios inducidos en los linfocitos T, también se observan en los niveles de expresión de las inmunoglobulinas. La administración sublingual de un extracto alérgico induce la producción de anticuerpos IgG e IgA¹²³.

La modulación de la respuesta de los linfocitos T CD4+ específicos de alérgeno ejerce un notable efecto en la respuesta de anticuerpos, como consecuencia de la alteración en el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas, relacionado con la producción de citoquinas. Durante la ITSL, los niveles séricos de la IgE específica frente al alérgeno se incrementan al iniciar la terapia, si bien durante la fase de mantenimiento descienden a niveles pretratamiento (después de 6 meses a 1 año o más de tratamiento); adicionalmente, se observa

¹¹⁹ Suárez-Fueyo A, Ramos T, Galán A, Jimeno L, Wurtzen PA, Marin A, de Frutos C, Blanco C, Carrera AC, Barber D, Varona R. Grass Tablet sublingual Immunotherapy downregulates the TH2 cytokine response followed by regulatory T-cell generation. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Jan;133(1):130-8.e1-2. doi: 10.1016/j.jaci.2013.09.043. Epub 2013 Nov 28

¹²⁰Bohle B, Kinaciyan T, Gerstmayr M, Radakovics A, Jahn-Schmid B, Ebner C. Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:707-13.

¹²¹Nieminen K, Laaksonen K, Savolainen J. Three-year follow-up study of allergen-induced in vitro cytokine and signalling lymphocytic activation molecule mRNA responses in peripheral blood mononuclear cells of allergic rhinitis patients undergoing specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 150:370-6.

¹²²Ebner C, Siemann U, Bohle B, Willheim M, Wiedermann U, Schenk S 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 Phi p 1, a major grass pollen allergen. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 1007–1015.

¹²³Rask C, Brimnes J, Lund K. Shorter dosing intervals of sublingual immunotherapy lead to more efficacious treatment in a mouse model of allergic inflammation. *Scand J Immunol* 2010; 71:403–412.

frecuentemente un despunte importante de la respuesta de memoria durante la re-exposición al alérgeno¹²⁴.

Este incremento de la respuesta IgE¹²⁵ es bien tolerado y se produce en la mayoría de los pacientes, incluidos quienes presentan beneficio clínico documentado.

A la par de los cambios de la IgE durante la ITSL, el análisis de los subtipos de IgG muestra una inducción, ya a las dos 2 semanas y durante más de 1 año tras suspender el tratamiento con inmunoterapia; se ha observado un incremento de IgG4, IgA e IgG1 –específicas del alérgeno, con aumentos de 10 a 100 veces de sus niveles en suero¹²⁶. Con la ITSL también se ha descrito un efecto bloqueante

¹²⁴Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:18-27

Moingeon P, Batard T, Fadel R, Frati F, Sieber J, Overtvelt L. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy* 2006; 61:151-65.

Bahceciler NN, Galip N. Comparing subcutaneous and sublingual immunotherapy: what do we know? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012;12:640-7

Bahceciler NN, Arikan C, Taylor A, Akdis M, Blaser K, Barlan IB, et al. Impact of sublingual immunotherapy on specific antibody levels in asthmatic children allergic to house dust mites. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136:287-94 7.

¹²⁵Moingeon P. Update on immune mechanisms associated with sublingual immunotherapy: Practical implications for the clinician. *J Allergy Clin Immunol: In Practice* 2013; 1: 228-41.

¹²⁶van 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.

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.

Reisinger J, Horak F, Pauli G, van Hage M, Cromwell O, König F y cols. 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.

Fujimura T, Yonekura S, Horiguchi S, Taniguchi Y, Saito A, Yasueda H, y cols. Increase of regulatory T cells and the ratio of specific IgE to total IgE are candidates for response monitoring or prognostic biomarkers in 2-year sublingual immunotherapy (SLIT) for Japanese cedar pollinosis. *Clin Immunol* 2011; 139:65-74.

Bahceciler NN, Arikan C, Taylor A, Akdis M, Blaser K, Barlan IB, et al. Impact of sublingual immunotherapy on specific antibody levels in asthmatic children allergic to house dust mites. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136:287-94 7.

de la IgG4 en las respuestas mediadas por IgE, que conlleva una disminución en la liberación de histamina por los basófilos¹²⁷.

Un mecanismo por el cual la inmunoterapia suprime la respuesta alérgica es el aumento en la producción del anticuerpos IgG específicos y, más propiamente, de IgG4. En el contexto de la hipersensibilidad mediada por IgE, la aparición de anticuerpos IgG4 se asocia, generalmente, con una disminución en los síntomas. Es probable que sea debido, al menos en parte, a un efecto de bloqueo de alérgeno a nivel de los mastocitos y/o de las células presentadoras de antígeno (prevención de la activación facilitada por IgE de los linfocitos T)¹²⁸. La idea anterior también es sustentada por los estudios que refieren que la ITSL favorece la producción de anticuerpos bloqueantes IgG y los linfocitos Treg conducen a una inhibición de la respuesta Th2¹²⁹. Por otra parte, la IgG4 no activa la cascada del complemento y es capaz de inhibir la formación de complejos inmunes por otros subtipos de IgG, dando a este subtipo de IgG características anti-inflamatorias¹³⁰.

¹²⁷James LK, Shamji MH, Walker SM, Wilson DR, Wachholz PA, Francis JN, et al. Long term tolerance after allergen immunotherapy is accompanied by selective persistence of blocking antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:509-16.

Shamji MH, Ljorring C, Francis JN, Calderon MA, Larche M, Kimber I, et al. Functional rather than immunoreactive levels of IgG4 correlate closely with clinical response to grass pollen immunotherapy. *Allergy* 2012; 67:217-26.

¹²⁸Aalberse RC, Stapel SO, Schuurman J, Rispens T: Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy* 2009, 39:469-477.

¹²⁹Samsom JN, van Berkel LA, van Helvoort JM, Unger WW, Jansen W, Thepen T, et al. Fc gamma RIIb regulates nasal and oral tolerance: a role for dendritic cells. *J Immunol* 2005; 174: 5279-87.

van Helvoort JM, Samsom JN, Chantry D, Jansen W, Schadee-Eestermans I, Thepen T, et al. Preferential expression of IgG2b in nose draining cervical lymph nodes and its putative role in mucosal tolerance induction. *Allergy* 2004;59:1211-8. Moingeon P, Batard T, Fadel R, Frati F, Sieber J, Van Overtvelt L. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy*. 2006; 61: 151-65.

¹³⁰Jakobsen CG, Bodtger U, Kristensen P, Poulsen LK, Roggen EL. Isolation of high affinity human IgE and IgG antibodies recognising Bet v 1 and Humicola lanuginosa lipase from combinatorial phage libraries. *Mol Immunol* 2004;41:941-9537.

Dado que la producción de IgE frente a un antígeno, normalmente inofensivo, es una de las características de las respuestas de hipersensibilidad de tipo I, la producción de anticuerpos IgG específicos del antígeno puede antagonizar y bloquear la cascada inflamatoria alérgica resultante del reconocimiento de antígenos mediado por IgE. Por lo tanto, el cambio en el equilibrio entre la IgE e IgG4 parece ser importante para el éxito de ITSL, aunque este aspecto no está totalmente demostrado. Se ha demostrado que los anticuerpos IgG4 específicos del alérgeno (con su actividad inhibidora frente a la respuesta IgE) persisten después de la interrupción del tratamiento y se ha especulado que podrían ser responsables de la tolerancia clínica a largo plazo¹³¹. La inducción de IgG4 específica tiene la capacidad de influir en la respuesta alérgica en diferentes formas, y se relaciona con los mecanismos efectores inmunológicos, responsables también de las respuestas de fase tardía y la inflamación alérgica en curso.

Otros estudios han demostrado que la mejoría sintomática se correlaciona con la reducción del número de eosinófilos y de la expresión de IL- 5 en la mucosa nasal¹³² durante la temporada polínica, así como con el aumento de la

Jakobsen CG, Bodtger U, Poulsen LK, Roggen EL. Vaccination for birch pollen allergy: comparison of the affinities of specific immunoglobulins E, G1 and G4 measured by surface plasmon resonance. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:193–198.

Jakobsen CG, Wahn U, Bilo M. Allergen-specific immunotherapy provides immediate, long-term and preventive clinical effects in children and adults: the effects of immunotherapy can be categorised by level of benefit -the centenary of allergen specific subcutaneous immunotherapy. *Clinical and Translational Allergy* 2012, 2:8.

¹³¹James LK, Shamji MH, Walker SM, Wilson DR, Wachholz PA, Francis JN, Jacobson MR, Kimber I, Till SJ, Durham SR: Long-term tolerance after allergen immunotherapy is accompanied by selective persistence of blocking antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 2011, 127:509-516

¹³²Wilson DR, Nouri-Aria KT, Walker SM, Pajno GB, O'Brien F, Jacobson MR, Mackay IS, Durham SR: Grass pollen immunotherapy: symptomatic improvement correlates with reductions in eosinophils and IL-5 mRNA expression in the nasal mucosa during the pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 2001, 107:971-976.

producción de $\text{INF-}\gamma^{133}$. Como se ha indicado, el $\text{TGF-}\beta$ es también producido por los linfocitos T reguladores, inducido por la inmunoterapia¹³⁴, que es responsable de la disminución de la respuesta Th2, con la reducción de la producción de IL-5¹³⁵ y la prevención de la eosinofilia inducida por la exposición a alérgenos y, por tanto, de la inflamación¹³⁶.

En resumen, en la ITSL el extracto alérgico es administrado debajo de la lengua durante 1-2 minutos; el alérgeno se une al epitelio inmediatamente, al parecer como consecuencia de interacción electrostática con las cargas negativas del glicocálix en la superficie de las células epiteliales¹³⁷. Posteriormente, el alérgeno atraviesa la mucosa en unos 15 a 30 minutos, siendo capturado y procesado por CPA. Esta absorción se produce en las capas superiores de los tejidos orales, con la participación de las CL en la propia mucosa, y de DCm/macrófagos a nivel de la lámina propia. Después de la captura, las CPA migran dentro de las siguientes 24 a 48 horas hacia los nódulos linfáticos cervicales y , donde el péptido derivado del alérgeno procesado es

¹³³ 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, 97:1356-1365.

¹³⁴ 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, 33:1205-1214.

¹³⁵ 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, 105:56-62.

¹³⁶ Wilson DR, Nouri-Aria KT, Walker SM, Pajno GB, O'Brien F, Jacobson MR, Mackay IS, Durham SR: Grass pollen immunotherapy: symptomatic improvement correlates with reductions in eosinophils and IL-5 mRNA expression in the nasal mucosa during the pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 2001, 107:971-976.

¹³⁷ Allam JP, Novak N, Fuchs C, Asen S, Berge S, Appel T, et al. Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans cell type with high constitutive FcεRI expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:141-8.

presentado a los linfocitos T CD4+ vírgenes del ganglio linfático¹³⁸. La respuesta de los linfocitos T CD4+ de tipo Th1 y Treg se induce en unos pocos días, con una posterior migración de esas células dentro del torrente sanguíneo, con regreso a la mucosa¹³⁹. Se cree que los linfocitos T CD4+ son críticos en el control de ambas respuestas de anticuerpos, así como en el reclutamiento celular de las células inflamatorias a la mucosa¹⁴⁰.

1.4 Eficacia y seguridad de la inmunoterapia

1.4.1 Eficacia y Seguridad de la Inmunoterapia Sublingual

Aunque la inmunoterapia subcutánea ha sido previamente considerada como referencia de inmunoterapia específica con alérgenos, actualmente, la ITSL se está posesionando en Europa como una alternativa no invasiva válida para el tratamiento de rinoconjuntivitis alérgica tipo I, sin o con asma leve a moderada, en adultos y en niños¹⁴¹. La capacidad de la ITSL para modular la enfermedad a

¹³⁸Mascarell L, Saint-Lu N, Moussu H, Zimmer A, Louise A, Lone Y, et al. Oral macrophage-like cells play a key role in tolerance induction following sublingual immunotherapy of asthmatic mice. *Mucosal Immunol* 2011; 4: 638-47.

¹³⁹Mascarell L, Lombardi V, Louise A, Saint-Lu N, Chabre H, Moussu H, et al. Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4⁺ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 603-9.

¹⁴⁰Moingeon P, Batard T, Fadel R, Frati F, Sieber J, Overtvelt L. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy* 2006; 61:151-65.

O'Hehir RE, Sandrini A, Anderson GP, Rolland JM. Sublingual allergen immunotherapy: immunological mechanisms and prospects for refined vaccine preparation. *Curr Med Chem* 2007; 14: 2235-44.

Scadding G, Durham S. Mechanisms of sublingual immunotherapy. *J Asthma* 2009; 46:322-34. (Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 18-27.

Bahceciler NN, Galip N. Comparing subcutaneous and sublingual immunotherapy: what do we know? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012; 12:640-7.

¹⁴¹Wilson DR, Torres Lima M, Durham SR. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2005; 60:4-12. (Durham SR, Yang WH, Pederson MR, Johansen N, Rak S. Sublingual immunotherapy with once-daily grass allergen tablets: a randomized controlled trial in seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 802-9.

largo plazo y evitar nuevas sensibilizaciones a alérgenos, así como para mejorar la sintomatología asmática, e incluso la alergia a los alimentos o la dermatitis atópica, ha aumentado el interés por la ITSL a nivel mundial¹⁴².

En relación con la inmunoterapia no solo interviene el resultado del contacto del alérgeno con la mucosa oral; adicionalmente interviene la frecuencia del contacto; en este sentido Rask y cols., demostraron que las citocinas Th2 cuantificadas a nivel sistémico disminuyen después de la administración diaria de ITSL en comparación con el placebo, mientras que no observaron ninguna o

Didier A, Malling HJ, Worm M, Horak F, Jager S, Montagut A, et al. Optimal dose, efficacy, and safety of once-daily sublingual immunotherapy with a 5-grass pollen tablet for seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 1338-45.

Dahl R, Kapp A, Colombo G, de Monchy JGR, Rak S, Emminger W, et al. Sublingual grass allergen tablet immunotherapy provides sustained clinical benefit with progressive immunologic changes over 2 years. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:512-8.

Durham SR. Sublingual immunotherapy: what have we learnt from the "big trials"? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; 8: 577-84.

Passalacqua G, Durham SR. Allergic rhinitis and its impact on asthma update: allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:881-91.

Radulovic S, Wilson D, Calderon M, Durham S. Systematic reviews of sublingual immunotherapy (SLIT). *Allergy* 2011; 66:740-52.

¹⁴²Cox L, Jacobsen L. Comparison of allergen immunotherapy practice patterns in the United States and Europe. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2009; 103:451-60.

Park IH, Hong SM, Lee HM. Efficacy and safety of sublingual immunotherapy in Asian children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2012; 76:1761-6.

Marogna M, Spadolini I, Massolo A, Canonica GW, Passalacqua G. Longlasting effects of sublingual immunotherapy according to its duration: a 15 year prospective study. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:969-75.

Didier A, Malling H-J, Worm M, Horak F, Sussman G, Melac M, et al. Posttreatment efficacy of discontinuous treatment with 300 IR 5-grass pollen sublingual tablet in adults with grass pollen-induced allergic rhinoconjunctivitis. *Clin Exp Allergy* 2013;43:568-77.

Passalacqua G, Lombardi C, Troise C, Canonica GW. Sublingual immunotherapy: certainties, unmet needs and future directions. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2009; 41: 163-70.

Fleischer DM, Burks WA, Vickery BP, Scurlock AM, Wood RA, Jones SM, et al. Sublingual immunotherapy for peanut allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:119-27

Cox L, Casale TB, Nayak AS, Bernstein DI, Creticos PS, Ambroisine L, et al. Clinical efficacy of 300 IR 5-grass pollen sublingual tablet in a US study: the importance of allergen-specific serum IgE. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:1327-34

Park D, Daher N, Blaiss MS. Adult and pediatric clinical trials of sublingual immunotherapy in the USA. *Expert Rev Clin Immunol* 2012; 8:557-64. Novak N, Haberstock J, Bieber T, Allam JP. The immune privilege of the oral mucosa. *Trends Mol Med* 2008; 14:191-8.

limitada alteración cuando fue administrada con menor frecuencia y a intervalos largos de tiempo¹⁴³.

A la luz de los hallazgos recientes que describen las interacciones específicas entre ciertos alérgenos y moléculas expresadas por las APC, es interesante especular que Phl p 5 podría ser otro ejemplo de un alérgeno con actividad adyuvante intrínseca en virtud de su capacidad para interactuar con componentes del sistema inmune innato¹⁴⁴.

Un estudio de Rask y cols., realizado en ratones, concluyó que la mayor frecuencia de la administración sublingual de extracto de alérgeno tiene un profundo impacto positivo sobre el efecto de la ITSL, medido como la inducción de anticuerpos IgG e IgA. La ITSL diaria era el único régimen de tratamiento capaz de reducir todas las citocinas Th2 a nivel sistémico y las respuestas de anticuerpos IgE en comparación con el placebo. El grupo que recibió la ITSL con la frecuencia más alta de administración presentaba el efecto más pronunciado del tratamiento. En el mismo grupo, también hubo un mayor grado de protección contra el aumento de los niveles de anticuerpos IgE después de la exposición intranasal con el alérgeno¹⁴⁵.

¹⁴³Rask C, Brimnes J, Lund K. Shorter dosing intervals of sublingual immunotherapy lead to more efficacious treatment in a mouse model of allergic inflammation. *Scand J Immunol* 2010; 71:403–412.

¹⁴⁴Wills-Karp M, Nathan A, Page K, Karp CL. New insights into innate immune mechanisms underlying allergenicity. *Mucosal Immunol* 2010; 3: 104-10.

¹⁴⁵Rask C, Brimnes J, Lund K. Shorter dosing intervals of sublingual immunotherapy lead to more efficacious treatment in a mouse model of allergic inflammation. *Scand J Immunol* 2010; 71:403–412.

En la búsqueda de biomarcadores se ha abarcado el estudio de MicroRNA (miRNA) como contribuyentes en la regulación de la polarización de las CD (células dendríticas), tal es el caso presentado por Lombardi V y cols (2017)¹⁴⁶ en donde al estudiar los niveles de miRNA específicos de las CD en pacientes con rinitis alérgica (tratados con tabletas sublinguales de polen de césped) versus controles no alérgicos, demostraron que la expresión de dos miRNA, vinculados a CD efectoras (células DC1 y / o DC2), se redujo en la sangre de pacientes con rinoconjuntivitis alérgica. Sin embargo, esos miRNA no representaron ser biomarcadores relevantes para predecir la eficacia del ITA, debido a que sus niveles no se modificaron significativamente después de cuatro meses de inmunoterapia.

Más recientemente, el artículo de Comberiat P y cols (2017)¹⁴⁷ hace énfasis en las necesidades no cubiertas en relación a la ITA respecto de enfermedades respiratorias alérgicas en niños, y remarca como una de las principales necesidades insatisfechas en el ámbito de la ITA la falta de un biomarcador predictivo para su eficacia. La importancia de contar con un biomarcador permite identificar a los pacientes respondedores a la ITA antes de que se inicie un tratamiento costoso y de larga duración¹⁴⁸.

¹⁴⁶ Lombardi V, Luce S, Moussu H, Morizur L, Gueguen C, Neukirch C, Chollet-Martin S, Mascarell L, Aubier M, Baron-Bodo V, Moingeon P. Effector and regulatory dendritic cells display distinct patterns of miRNA expression. *Immun Inflamm Dis*. 2017 May 12.

¹⁴⁷COMBERIATI P, MARSEGLIA GL, BARBERI S, PASSALACQUA G, PERONI DG. ALLERGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY FOR RESPIRATORY ALLERGY IN CHILDREN: UNMET NEEDS AND FUTURE GOALS. *J ALLERGY* 2017 APR 4. PII: S2213-2198(17)30045-4. DOI: 10.1016/J.JAIP.2017.01.024.

¹⁴⁸Passalacqua G, Canonica GW. AIT (allergen immunotherapy): a model for the "precision medicine". *Clin Mol Allergy* 2015;13: 24.

Según Moingeon, la mayoría de estudios clínicos que han hallado cambios inmunitarios durante la ITSL han sido pequeños estudios de diseño abierto que no han permitido la correlación de estos cambios con la mejoría clínica a nivel del paciente individual. Por lo tanto no hay ningún biomarcador (se pueden definir como parámetro biológico que puede ser objetivamente medido para monitorizar o predecir la gravedad de las enfermedades o la eficacia de los tratamientos) que demuestre la eficacia de la ITS. En la anterior afirmación se centra Moingeon, clasificando los biomarcadores en tres grupos en relación a la duración de la ITSL, biomarcadores a corto plazo (días), a medio plazo (hasta 6 meses) o a largo plazo (6 meses a varios años)¹⁴⁹.

1.4.2 Biomarcadores de eficacia

Biomarcadores de eficacia a corto plazo

Son actualmente desconocidos, se asocian con una disminución de la reactividad de la piel y un beneficio clínico fácilmente detectable dentro de días (se van a expresar relativamente rápido)¹⁵⁰.

¹⁴⁹Moingeon P. Update on immune mechanisms associated with sublingual immunotherapy: Practical implications for the clinician. J Allergy Clin Immunol: In Practice 2013;1: 228-41.

¹⁵⁰Passalacqua G, Albano M, Riccio A, Fregonese L, Puccinelli P, Parmiani S, y cols. Clinical and immunologic effects of a rush sublingual immunotherapy to Parietaria species: a double-blind, placebo-controlled trial. J Allergy Clin Immunol 1999; 104:964-8.

En un estudio de 2009, que se realizó en una cohorte de pacientes con alergia al polen de gramíneas, Horak y cols., sugirieron que la ITSL puede ser eficaz en la disminución de los síntomas en un plazo tan corto como una semana¹⁵¹

BIOMARCADORES DE EFICACIA A MEDIO PLAZO

Dentro de la eficacia a medio plazo se ha realizado, entre otros, un ensayo aleatorio controlado con placebo doble ciego de ITSL que evaluaba una cohorte de 89 pacientes con alergia al polen de gramíneas, cuyos integrantes recibieron tratamiento durante más de 4 meses; se encontró que los pacientes que recibieron tratamiento con comprimidos sublinguales de gramíneas presentaron una reducción de los síntomas ya al mes de tratamiento, con un beneficio clínico sostenido hasta incluso 3 meses posteriores al tratamiento, a diferencia del grupo placebo¹⁵².

Durante este tiempo de 4 meses no hubo disminución de los linfocitos Th2, incluso en los pacientes con respuesta clínica confirmada, lo que, junto con el hecho de que los niveles de IgE en suero no se modificaron en ese marco de tiempo, llevaron a concluir que la ITSL aporta beneficio clínico, independientemente de cualquier depleción o reducción de las células inmunes que median las respuestas Th2, incluyendo linfocitos T de memoria CD4+

¹⁵¹Horak F, Ziegelmayer P, Lemell P, Devillier P, Montagut A, Melac M, y cols. Early onset of action of a 5-grass-pollen 300-IR sublingual immunotherapy tablet evaluated in an allergen challenge chamber. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:471-7.

¹⁵²Horak F, Ziegelmayer P, Lemell P, Devillier P, Montagut A, Melac M, et al. Early onset of action of a 5-grass-pollen 300-IR sublingual immunotherapy tablet evaluated in an allergen challenge chamber. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:471-7.

productores de IL-5, así como linfocitos B de memoria secretores de IgE¹⁵³. Aunque la relación entre la IgE específica y total ha sido propuesta como un marcador potencial de eficacia de la ITSL¹⁵⁴, este hecho no se confirmó en el citado estudio de Horak.

Los hallazgos del estudio anterior podrían indicar una señal temprana de la polarización de la respuesta inmune adaptativa específica del alérgeno que persiste en la sangre periférica¹⁵⁵.

Biomarcadores de eficacia a largo plazo

Actualmente no se dispone de ningún biomarcador que refleje la eficacia de la ITSL a largo plazo (Moingeon)¹⁵⁶; sin embargo, en un estudio doble ciego controlado con placebo de Scadding y cols, realizado en 2010, en el que se efectuaron biopsias de la mucosa sublingual a tres grupos de pacientes (14 atópicos tratados con ITSL, 9 atópicos tratados con placebo y 8 controles no alérgicos), mostró un aumento de linfocitos T CD4+ FOXP3+ y CD25+ FOXP3+

¹⁵³Bonvalet M, Moussu H, Wambre E, Ricarte C, Horiot S, Rimaniol AC, y cols. Allergen-specific CD4⁺ T cell responses in peripheral blood do not predict the early onset of clinical efficacy during grass pollen sublingual immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2012;42:1745-55.

Wambre E, DeLong JH, James EA, Lafond RE, Robinson D, Kwok WW, et al. Differentiation stage determines pathologic and protective allergen-specific CD4⁺ T-cell outcomes during specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:544-51.

Horak F, Ziegelmayer P, Lemell P, Devillier P, Montagut A, Melac M, et al. Early onset of action of a 5-grass-pollen 300-IR sublingual immunotherapy tablet evaluated in an allergen challenge chamber. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:471-7.

¹⁵⁴Fujimura T, Yonekura S, Horiguchi S, Taniguchi Y, Saito A, Yasueda H, et al. Increase of regulatory T cells and the ratio of specific IgE to total IgE are candidates for response monitoring or prognostic biomarkers in 2-year sublingual immunotherapy (SLIT) for Japanese cedar pollinosis. *Clin Immunol* 2011; 139:65-74.

Di Lorenzo G, Mansueto P, Pacor ML, Rizzo M, Castello F, Martinelli N, et al. Evaluation of serum s-IgE/total IgE ratio in predicting clinical response to allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:1103-10.

¹⁵⁵Moingeon P. Update on immune mechanisms associated with sublingual immunotherapy: Practical implications for the clinician. *J Allergy Clin Immunol: In Practice* 2013; 1:228-41.

¹⁵⁶ ibíd

en la mucosa sublingual y aumento de IgG1 (IgG1 e IgG4) periféricas específicas de alérgenos tras la ITSL (con extracto de *Phleum pratense*)¹⁵⁷.

En relación a la IgE específica se ha documentado su disminución después de 6 meses a 1 año de ITSL¹⁵⁸.

La inmunoglobulina IgG4 específica regresa a sus niveles previos al tratamiento después de 1 año de haber interrumpido el tratamiento, a pesar de mantenerse el beneficio clínico¹⁵⁹. En el estudio de James y cols., la mejoría clínica se mantuvo hasta después de 2 años de suspender la inmunoterapia. Aunque los niveles de IgG4 y IgG1 específicos del polen de gramíneas inducidos por inmunoterapia disminuyeron a los niveles previos al tratamiento cuando se suspendió, la actividad inhibitoria del anticuerpo IgG alérgeno-específico permaneció sin cambios¹⁶⁰

Ozdemir y cols, mostraron que, en un grupo de niños entre 4 y 16 años con asma alérgica por ácaros, 3 años de tratamiento con ITSL junto con la administración de farmacoterapia se asociaron con una reducción, tanto de la dosis como de la

¹⁵⁷(Scadding GW, Shamji MH, Jacobson MR, Lee DI, Wilson D, Lima MT, et al. Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B cells. Clin Exp Allergy 2010; 40:598-606.)

¹⁵⁸Moingeon P, Batard T, Fadel R, Frati F, Sieber J, Overtvelt L. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. Allergy 2006; 61:151-65.)(Bahceciler NN, Galip N. Comparing subcutaneous and sublingual immunotherapy: what do we know? Curr Opin Allergy Clin Immunol 2012; 12: 640-7.

¹⁵⁹Baron-Bodo V, Batard T, Nguyen H, Fréreau M, Horiot S, Harwanegg KC, et al. Absence of IgE neosensitization in house dust mite allergic patients following sublingual immunotherapy. Clin Exp Allergy 2012; 42:1510-8.

¹⁶⁰James LK, Shamji MH, Walker SM, Wilson DR, Wachholz PA, Francis JN, et al. Long term tolerance after allergen immunotherapy is accompanied by selective persistence of blocking antibodies. J Allergy Clin Immunol 2011; 127:509-16.

necesidad de utilizar los corticosteroides inhalados en comparación con los controles¹⁶¹.

En relación a la seguridad, Cox y cols., en una revisión de ITSL donde se identificaron 66 publicaciones que incluían la seguridad (representaban 4,378 pacientes y aproximadamente 1.181.000 dosis de ITSL) consideraron que la ITSL tiene un mejor perfil de seguridad que la ITSC, y que muchas de sus reacciones son locales y transitorias, que, aunque se presentan en un 40-75% de los pacientes, principalmente al inicio de la inmunoterapia sublingual, no obligan, en general, a suspenderla o a disminuir la dosis de tratamiento. Adicionalmente, los autores encontraron una tasa de reacciones adversas graves de 1 por 384 tratamientos/año; 11 casos de anafilaxia inducida por ITSL, equivalentes a alrededor de 1 caso por 100 millones de dosis de ITSL administradas o por 526.000 tratamientos/año (usando un valor de media de 190 dosis por tratamiento/año); entre las reacciones sistémicas más frecuentes estuvieron: reacciones asmáticas, dolor abdominal, vómitos, edema de úvula y urticaria¹⁶².

La Organización Mundial de Alergología (WAO), en el 2009, hizo referencia a 14 casos no mortales de reacciones alérgicas sistémicas relacionadas con la ITSL, en 3.944 pacientes tratados con un total de 1.019.826 dosis en 58 estudios, lo que representa 1,4 eventos adversos graves por 384 tratamientos/año o 285 pacientes. Entre la clínica que más destacó se encontró: reacciones asmáticas

¹⁶¹Ozdemir C, Yazı D, Gocmen I, Yesil O, Aydogan M, Semic-Jusufagic A, Bahceciler NN, Barlan IB. *Pediatr Allergy Immunol*. 2007 Sep; 18(6):508-15.

¹⁶²Cox LS, Larenas-Linnemann D, Nolte H, Weldon D, Finegold I, Nelson HS. Sublingual immunotherapy: a comprehensive review. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:1021–1035.

(7), una de las cuales requirió hospitalización, dolor abdominal/vómito (3), edema de úvula (1) y urticaria con duración de 48 horas, y 4 casos de anafilaxia¹⁶³.

1.5 Vaccinómica

La Medicina de Precisión está enfocada a la adecuación terapéutica atendiendo a las características individuales de los pacientes, lo que permite mejorar tanto la eficacia como la seguridad terapéutica. En este sentido la Alergología es una especialidad que ha anticipado la aplicación de la Medicina de Precisión en un modelo que adapta la composición de la inmunoterapia a los alérgenos específicos a los que está sensibilizado cada paciente. La práctica alergológica ha sido pionera en la incorporación de la individualización del tratamiento, lo que proporciona una importante referencia para otras especialidades en este modelo de Personalización de la Medicina¹⁶⁴. La vacunología es «una disciplina científica, rama de la terapéutica, que se encarga del estudio de las vacunas, de su producción, investigación básica y clínica, eficacia, efectividad y eficiencia, así como de la epidemiología de las enfermedades inmunoprevenibles antes y después de la utilización de las vacunas. Estudia también su administración sistemática y no sistemática, y la elaboración de calendarios vacunales¹⁶⁵» y el enorme desarrollo tecnológico de las ómicas adelanta la aparición de la vaccinómica que, según Poland y cols., incluiría los aspectos inmunogenéticos asociados a la respuesta a las vacunas y que permitirá la personalización de las

¹⁶³ *Canonica et al WAO Journal* • November 2009

¹⁶⁴ MCGHEE SA. HOW THE PRACTICE OF ALLERGY SHOWS THE PROMISE AND CHALLENGE OF PERSONALIZED MEDICINE. *MOL GENET METAB.* 2011 SEP-OCT; 104(1-2):3-6. DOI: 10.1016/J.YMGME.2011.07.017. Epub 2011 JUL 23.

¹⁶⁵ Real Academia Nacional de Medicina. *Diccionario de términos médicos*. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011.

vacunas basada en la información genotípica¹⁶⁶. Algunos ejemplos los encontramos en relación a la inmunoterapia de enfermedades infecciosas como la hepatitis o el sarampión.

Por lo tanto, como se ha comentado previamente para iniciar, monitorizar y completar con éxito la aplicación de la inmunoterapia se necesitan biomarcadores de predicción lo que pone de manifiesto la importante necesidad de identificar a los candidatos apropiados para la inmunoterapia. Para la consecución de este objetivo, como comenta Fujisawa¹⁶⁷, sería de gran utilidad el análisis de polimorfismos de los genes candidatos; sin embargo, este aspecto aún se está desarrollando.

Para la identificación de los posibles genes candidatos se han descrito algunos estudios que analizan los niveles de expresión génica de ciertas citocinas implicadas en la respuesta. De este modo, se ha observado que los individuos que recibieron inmunoterapia con polen de gramíneas presentaron un incremento en el número de células que expresaban mRNA de INF- γ en la mucosa nasal, siendo significativo comparado con el grupo placebo; además, se observó una correlación negativa entre este número de células y la puntuación de síntomas¹⁶⁸.

¹⁶⁶POLAND GA, OVSYANNIKOVA IG, JACOBSON RM. PERSONALIZED VACCINES: THE EMERGING FIELD OF VACCINOMICS. EXPERT OPIN BIOL THER. 2008 NOV; 8 (11):1659-67. DOI: 10.1517/14712598.8.11.1659.

¹⁶⁷FUJISAWA T, NAGAO M, HIRAGUCHI Y, HOSOKI K, TOKUDA R, USUI S, MASUDA S, SHINODA M, HASHIGUCHI A, YAMAGUCHI M. BIOMARKERS FOR ALLERGEN IMMUNOTHERAPY IN CEDAR POLLINOSIS. ALLERGOL INT. 2009 JUN; 58(2):163-70. DOI: 10.2332/ALLERGOLINT.09-RAI-0097. EPUB 2009 APR 25.

¹⁶⁸Durham SR, Ying S, Varney VA *et al.* 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

En términos de los linfocitos Th2, los aumentos estacionales en IL-5 y IL-9 que expresan las células en la mucosa nasal se inhibieron de manera significativa en los pacientes tratados con inmunoterapia¹⁶⁹.

En ausencia de IL-12, la IL-18 induce en los mastocitos y basófilos la expresión de IL-18RA para producir IL-4 e IL-13, lo que resulta en un aumento de los niveles IgE¹⁷⁰.

Dentro del desarrollo y diferenciación de los linfocitos T se encuentra el factor de transcripción GATA-3, el cual está asociado con la inducción de linfocitos Th2; las células que expresan GATA-3 desarrollan el perfil Th2, con la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13. La unión del GATA-3 en la región regulatoria de esos genes altera la estructura de la cromatina, incrementando la accesibilidad a otros factores de transcripción. El GATA-3 es activado por la IL-4 o autoactivado¹⁷¹.

En el estudio realizado por el grupo de Savolainen en CMBP, para evaluar *in vitro* la expresión del mRNA de las citocinas IL-10, IL-5 y TGF- β en 30 pacientes con rinitis alérgica al polen de árboles - 20 de ellos recibieron ITSL con diferentes dosis de polen y 10 recibieron placebo durante 2 años -¹⁷²; los autores

¹⁶⁹Wilson DR, Nouri-Aria KT, Walker SM *et al.* Grass pollen immunotherapy: symptomatic improvement correlates with reductions in eosinophils and IL-5 mRNA expression in the nasal mucosa during the pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:971-6

¹⁷⁰Yoshimoto T, Okamura H, Tagawa Y, Iwakura Y, Nakahishi K. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:3948-53.

¹⁷¹Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; 89:587-596. (*J Biol Chem* 1997; 272:21597-21603.

¹⁷²Savolainen J, Jacobsen L, Valovirta E. Sublingual immunotherapy in children modulates allergen-induced *in vitro* expression of cytokine mRNA in PBMC. *Allergy* 2006; 61: 1184-1190.

demonstraron que la ITSL tiene efectos sistémicos que se reflejan en la CMBP, además de un claro efecto dosis-respuesta. Los resultados mostraron, en los grupos que recibieron la dosis baja y en el grupo placebo, niveles disminuidos o poco aumentados de la expresión del ARNm de la IL-10 y del TGF- β ; en tanto que el grupo que recibió la dosis más alta presentó claros aumentos de la expresión del ARNm de la interleucina reguladora IL-10 y del TGF- β , mostrando buena correlación entre sí; adicionalmente, un efecto inhibitor sobre el aumento de la expresión del ARNm de IL-5. Concluyendo dicho grupo en que las citocinas contribuirían en la regulación negativa de la respuesta alérgica.

Regresando con Savolainen (2007) los autores observaron que el mRNA de IL-18 producido por los linfocitos Treg y Th1 parece aumentar durante la SLIT asociándose con la disminución del tamaño de la respuesta cutánea de fase tardía (LPSR); también se produjo un incremento de la expresión de IL-18 en sangre periférica o en el exudado nasal de los pacientes con asma o rinitis alérgica. Sin embargo, se observó que, en presencia de IL-12, la IL-18 claramente mejora la respuesta inmune tipo Th1, incluyendo la producción de IFN- γ y, por ende, disminuyen los niveles de IgE. Este grupo hizo referencia a que las respuestas tempranas son esenciales en la ITSC, mientras que en la SLIT, las respuestas se pueden apreciar después de recibir por un largo período las dosis de mantenimiento.

En un estudio realizado en ratones a los que se administró SLIT se observó una disminución significativa de los niveles de IgE específica, así como la supresión de la respuesta inmune Th2. También se observó que la SLIT con ovoalbúmina

no alteró el número de linfocitos Treg, pero aumentó la expresión génica de *Foxp3* e *IL-10* en los linfocitos Treg de los ganglios linfáticos cervicales¹⁷³.

Si bien todos estos estudios describen posibles modificaciones en los niveles de expresión génica, prácticamente no existen estudios que aborden las modificaciones en las secuencias de sus genes codificantes, a excepción de las variaciones en la secuencia de los genes de HLA, que podrían estar relacionadas con la respuesta a la inmunoterapia frente a la alergia al veneno de himenópteros. En este estudio se indica que los polimorfismos en las secuencias génicas del HLA podrían estar relacionadas con el éxito de la inmunoterapia en estos pacientes¹⁷⁴.

Por lo tanto debido a la escasez de estudios en este sentido y a la importancia de la caracterización inmunogenotípica de la inmunoterapia personalizada para mejorar la eficacia y la seguridad nos proponemos abordar este proyecto de tesis doctoral.

¹⁷³Yamada T, Tongu M, Goda K, Aoi N, Morikura I, Fuchiwaki T, Kawauchi H. Sublingual Immunotherapy Induces Regulatory Function of IL-10-Expressing CD4+CD25+Foxp3+ T Cells of Cervical Lymph Nodes in Murine Allergic Rhinitis Model. *Journal of Allergy* Volume 2012, Article ID 490905, 11 pages.

¹⁷⁴TARZI M¹, KLUNKER S, TEXIER C, VERHOEF A, STAPEL SO, AKDIS CA, MAILLÈRE B, KAY AB, LARCHÉ M. INDUCTION OF INTERLEUKIN-10 AND SUPPRESSOR OF CYTOKINE SIGNALLING-3 GENE EXPRESSION FOLLOWING PEPTIDE IMMUNOTHERAPY. *CLIN EXP ALLERGY*. 2006 APR; 36(4):465-74.

HIPÓTESIS

2 HIPÓTESIS

La exposición de un paciente con rinoconjuntivitis alérgica al alérgeno al que se encuentra sensibilizado induce una respuesta inmune inapropiada, con producción de citocinas Th2 e IgE específica, con reclutamiento y activación de basófilos, eosinófilos y mastocitos en la mucosa nasal/oral. La inmunoterapia es un tratamiento eficaz que permite redireccionar la respuesta inmune inapropiada. Los mecanismos moleculares que se producen en los estadios iniciales de la misma no son aún bien conocidos.

La hipótesis de este estudio se basa en que el análisis de las variables clínico-biológicas, los niveles de citocinas y los estudios génicos pueden contribuir a profundizar en el conocimiento de los mecanismos inmunológicos que subyacen en el efecto de la inmunoterapia y, en especial, en los estadios más precoces, en los que es posible que los síntomas clínicos aún no se vean afectados.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Analizar posibles mecanismos inmunológicos que subyacen a la respuesta inmunológica inducida por la inmunoterapia en los estadios iniciales de la misma, mediante el estudio de las variables clínico-biológicas y de los niveles de expresión de las citocinas mediadoras de la respuesta alérgica.

3.2 Objetivos específicos

1. Analizar las variables de eficacia del ensayo clínico y su posible relación con la duración de la IT.
2. Estudiar variables clínico-biológicas relacionadas con la respuesta inmunológica, en concreto, de IgE total y de IgE e IgG4 específicas frente al *Phleum pratense*
3. Analizar los niveles de las citocinas IL-1A, IL-1B, IL-1R, IL-RN, IL-2, IL-4, IL-4RA, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TGF- β 1 y TNF- α , en los pacientes alérgicos tratados con inmunoterapia sublingual, así como en el grupo placebo.
4. Estudiar las distribuciones alélicas, genotípicas y haplotípicas de 22 polimorfismos en 13 genes que codifican citocinas: *IL1A*, *IL1B*, *IL1R*, *ILRN*, *IL2*,

IL4, IL4RA, IL6, IL10, IL12, IFNG, TGFB1, TNFA, en una población comparable de controles y pacientes alérgicos, estrictamente caracterizados desde el punto de vista clínico.

5. Analizar la posible contribución de las variantes de los genes que codifican citocinas a los niveles de expresión de las misma y la potencial implicación de su inclusión en los ensayos clínicos.

MATERIAL Y MÉTODO

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Parámetros clínicos

El presente estudio se basa en un ensayo clínico prospectivo de fase II, aleatorizado, doble ciego, paralelo, controlado, dividido en tres subgrupos, dos de ellos tratado con inmunoterapia sublingual con dosis diferentes de extracto alérgico despigmentado y polimerizado con glutaraldehído de *Phleum pratense* y un tercer grupo tratado con placebo (Estudio 6078-PG-OSL-145, número de ensayo clínico: NCT00501527). El estudio observó todas las Normas reguladoras para Estudios Clínicos en España y fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Clínica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

A todos los pacientes se les entregó un consentimiento informado, que firmaron y fecharon previamente a la realización de cualquier acto del estudio.

A los efectos de los estudios genéticos se seleccionó una muestra de individuos control, que no participaron en el ensayo y que, igualmente, firmaron un consentimiento informado.

4.1.1 Individuos

Pacientes

Se seleccionaron pacientes que presentaban sintomatología de rinoconjuntivitis y/o asma alérgicas (carácter estacional mayo-junio). Los pacientes tenían que cumplir todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión.

Criterios de inclusión

- Pacientes de ambos sexos con edades comprendidas entre 12 y 40 años, con historia clínica de asma y/o rinoconjuntivitis debido a reacción alérgica frente al polen de *Phleum pratense*.
- Clínica compatible de alergia frente al polen de gramíneas.
- Pruebas cutáneas positivas frente al *Phleum pratense*: la pápula que produjo la prueba cutánea por medio de la técnica de intraepidermorreacción (*Prick-test*) debía ser igual o superior a la pápula producida por el control positivo (10 mg/ml de histamina). Se admitieron resultados de pruebas cutáneas con una antigüedad inferior a un año.
- Presencia de IgE específica frente al *Phleum pratense* (CAP \geq clase 3). Se aceptaron resultados de inmunoserología con una antigüedad inferior a un año.
- Pacientes con la capacidad de cumplir el régimen de dosificación y de prestar consentimiento informado. En el caso de pacientes menores de edad (entre los 12 y 17 años) se exigió el consentimiento informado por escrito de su representante legal y del propio paciente y se envió una copia de este consentimiento al Ministerio Fiscal (evento en que se informó además al representante legal del menor).

Criterios de exclusión

- Pacientes con asma o rinoconjuntivitis que habían sido tratados previamente con inmunoterapia en los últimos 4 años, o en los que estaba contraindicada la inmunoterapia según los criterios del Comité de Inmunoterapia de la Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica (Manejo práctico de la inmunoterapia, 1990) y del *European Allergy and Clinical Immunology Immunotherapy Subcommittee* (Malling y Weeke, 1993).
- Tratamiento con β -bloqueantes.
- Enfermedades en las que estuviera contraindicada la adrenalina.
- Patologías autoinmunitarias.
- Pacientes con limitación para seguir el protocolo y trastornos psiquiátricos severos.
- Coexistencia de intolerancia a la Aspirina.
- Pacientes embarazadas o en riesgo de embarazo, o en periodo de lactancia.

Para el estudio genético se incluyeron, además, 172 pacientes que presentaban asma y/o rinoconjuntivitis y pruebas cutáneas positivas frente a una batería de aeroalérgenos adaptada a la zona.

Controles para el estudio genético

Se incluyeron en el grupo un total de 157 individuos que acudieron al Servicio de Inmunoalergia del Complejo Asistencial de Salamanca y otorgaron su consentimiento informado y cumplían los siguientes criterios:

- Edad superior a 18 años.
- Ausencia de síntomas y antecedentes de asma.

- Ausencia de síntomas y antecedentes de otras enfermedades respiratorias.
- Ausencia de síntomas y antecedentes de alergia.
- Pruebas cutáneas negativas a la misma batería de aeroalérgenos que los pacientes.
- Ausencia de antecedentes de asma en familiares de primer grado.
- Ausencia de antecedentes de atopia en familiares de primer grado.

4.1.2 Visitas

Se realizaron 4 visitas principales, representadas en el flujograma de la tabla 3, pero que en caso de necesidad -del investigador o el paciente-, podían hacerse visitas adicionales.

Los pacientes podían abandonar voluntariamente el estudio en cualquier momento y las razones se registraron en las correspondientes hojas de abandono del cuadernillo de recogidas de datos, al igual que si el investigador decidía retirar al paciente del estudio, situación que podía tener lugar en los siguientes casos:

- Si se habían presentado desviaciones importantes en el protocolo o en caso de enfermedad intercurrente,
- Deterioro del paciente o aparición de efectos graves o molestos que impidieran continuar el tratamiento.

En presencia de tales circunstancias, se debía alertar al coordinador del estudio.

En caso de existir motivos médicos que desaconsejaban la continuación del paciente en el estudio, éste debía continuar bajo la supervisión médica, hasta

ser dado de alta, llevándose a cabo un registro de la evolución de la complicación y de las prácticas realizadas en búsqueda de solución a las complicaciones, según el caso.

Del total de los pacientes seleccionados, 3 no tomaron la medicación del estudio y 8 se excluyeron por desviación del protocolo.

Tratamientos del estudio

Tratamientos recibidos

Con el fin de ubicar temporalmente al lector, en la tabla 4 se indican las fechas de las diferentes épocas polínicas para los 2 años

El grupo 1 (G1) recibió una dosis de 1.000 DPP/ml (2 gotas/día de extracto, correspondiente cada gota a 45 µl), el grupo 2 (G2) recibió una dosis más alta, de 10.000 DPP/ml (2 gotas /día), y, por último, el grupo placebo (GP) recibió una solución con los mismos excipientes pero sin principio activo.

El intervalo de tiempo de tratamiento en los 3 grupos fue de 8 semanas durante la época prepolínica (principios del mes de marzo hasta finales del mes de abril en los años 2008 y 2009) y con un seguimiento de 8-12 meses.

Tabla 3. Flujograma de visitas*

	VB	V1	V2	V3	V4
	sept febr	(1-30 mar)	(1-15 may)	(1-20 jul)	(1-30 sept)
Revisión de la historia clínica	X				
Consentimiento informado	X				
Exploración física	X				
Criterios inclusión/exclusión	X				
<i>Prick-tests</i> (batería aeroalérgenos comunes)	X				X
Test de embarazo	X	X			
Extracción de sangre	X				X
Congelación del suero	X				X
<i>Prick-test</i> dosis respuesta	X				X
Test de provocación nasal	X				X
Cuestionario de calidad de vida para rinitis (RQLQ)	X			X	
Cuestionario de calidad de vida para asma (AQLQ)	X			X	
Escala analógica visual	X		X	X	
Administración de la primera dosis		X			
Entrega de la inmunoterapia		X			
Seguridad de la inmunoterapia		X	X	X	
Recogida de la inmunoterapia				X	
Entrega de la hoja de síntomas y tratamientos			X	X	
Recogida de la hoja de síntomas y tratamiento				X	X

*Las visitas se realizaron en los años 2008 y 2009. El tratamiento se inició en la visita 1 y duró un total de 8 semanas antes de la época polínica.

Tabla 4. Épocas polínicas.

FECHA		ÉPOCA POLÍNICA	
Años	Desde	Hasta	Total (días)
2008	25/JUN/2008	16/JUL/2008	22
2009	21/MAY/2009	11/JUN/2009	22

El número de pacientes inicialmente estimados fue de 90 (3 subgrupos de 30) pero finalmente se reclutaron de forma consecutiva un total de 80 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y firmaron el consentimiento informado. La selección de los pacientes se realizó entre septiembre y febrero de los años 2008 y 2009. Su asignación a los 3 grupos diferentes fue aleatoria, para lo cual se empleó una lista de números aleatorios generada por el programa informático C-4 *Study design pack* antes de la primera visita al estudio (visita 1), en la que se les administró la primera dosis del tratamiento. La asignación de tratamientos se realizó comenzando siempre por el número más bajo y avanzando de forma correlativa en orden creciente de aleatorización). La condición de doble ciego no se rompió en ningún momento del estudio.

Se administraron 2 gotas (45 µl) de solución acuosa que contenía extracto de polen de *Phleum pratense* para tratamiento oral sublingual al G1 (dosis de 1.000 DPP/ml de extracto alergénico), 2 gotas al G2 (10.000 DPP/ml de extracto alergénico) y 2 gotas al GP (solución acuosa con excipiente pero sin el extracto alergénico), una vez al día, iniciando la primera dosis en la visita 1 del estudio y durante las siguientes 8 semanas (previo a época polínica). Los extractos

alergénicos usados fueron fabricados por Laboratorios LETI, S.L.U., estandarizados y etiquetados en dosis DPP^{175*}. Los medicamentos administrados fueron fabricados por Laboratorios LETI, S.L.U., siguiendo las normas de correcta fabricación (NCF).

Las dos dosis de extractos alérgicos y el placebo se administraron de la misma forma (vía sublingual) y se presentaron en un vial etiquetado como vial 1.

Los tres tratamientos administrados presentaron los mismos excipientes (NaCl, glicerol y fenol) y el mismo pH (6,7 - 7,1). La solución administrada presentó un sabor dulce por la presencia de glicerol y un ligero sabor a metal por la presencia de fenol.

La primera dosis de inmunoterapia sublingual se administró en el hospital en la visita 1, el resto de dosis en el domicilio del paciente quien la recibía del vial (1 vial) suministrado en esa misma visita, devolviendo lo restante en la visita 3, donde se calculaba el contenido sobrante.

Medicación de rescate

Los medicamentos de rescate que se permitió tomar a los pacientes participantes en el estudio para la mejoría de los síntomas alérgicos, y que podían usar a libre demanda fueron:

- Loratadina.

¹⁷⁵Una DPP es la cantidad de alérgeno modificado que se obtiene después de despigmentar y polimerizar 1 HEPL -Histamine Equivalent Prick Leti.

- Mometasona.
- Salbutamol.
- Budesonida nasal (200 mcg).

En caso de no mejorar al tomar la medicación, debía acudir al Servicio de Alergia donde el paso a seguir era la toma de prednisolona 1mg/Kg/día a lo largo de 7 días.

La sintomatología manifestada, así como el consumo de medicación de rescate durante la época polínica quedaba consignada en las hojas de registro de síntomas y tratamiento farmacológico del paciente.

Posteriormente, para controlar los registros de los tratamientos recibidos simultáneamente los pacientes debían completar y devolver las hojas de registro de síntomas y tratamiento farmacológico que se les entregaron en las visitas 2 y 3.

Para controlar el cumplimiento terapéutico y de síntomas de rinoconjuntivitis y/o asma, el paciente debía entregar las hojas de Registro de Síntomas debidamente cumplimentadas, y no faltar a las visitas previstas.

Formulario recogida de datos

La información de los pacientes fue recogida desde la historia clínica y de los cuadernillos suministrados a los pacientes y a cargo del Alergólogo.

4.1.3 Variables

Variable principal de eficacia clínica

Para la variable de eficacia se tomó la media de la suma de las puntuaciones diarias de síntomas y de medicación de rescate en la época polínica, definida como 7 días antes y 14 días después del día con máximo recuento de polen (dado que en recuento de polen se observaron 2 días con el mismo valor máximo, se acordó escoger el día cuya suma de polen 7 días antes y 7 días después fuera mayor).

En el estudio se tuvo en cuenta la puntuación de síntomas y la puntuación de los medicamentos de rescate para tratar los síntomas alérgicos siguiendo las recomendaciones de la "Guideline on the clinical products for specific immunotherapy for the treatment of allergic diseases" de la Agencia Europea del Medicamento (EMA)¹⁷⁶.

Se evaluó la sintomatología nasal, bronquial y ocular, incluyendo estornudos, rinorrea, obstrucción nasal, prurito nasal y ocular, lagrimeo, tos, sibilancias y disnea. La puntuación de síntomas correspondió a la suma de la sintomatología nasal, bronquial y ocular.

¹⁷⁶ Guideline on the clinical development of products for specific immunotherapy for the treatment of allergic diseases. Committee for medicinal products for human use. EMEA. 2007 Doc.Ref.CHMP/EWP/18504/2006

Los pacientes registraron los síntomas específicos en el correspondiente diario del paciente durante los períodos polínicos.

El criterio de valoración de los síntomas fue:

0=Ninguno (sin síntomas evidentes)

1=Leves (trivial, el síntoma estaba claramente presente pero no era molesto)

2=Moderados (molestos pero no incapacitantes o intolerables)

3=Graves (incapacitantes y/o intolerables)

Para la valoración de la puntuación de la medicación, los pacientes registraron la medicación de rescate que habían tomado durante la estación polínica. La valoración de la puntuación se realizó de la siguiente forma:

- Loratadina: se valoró como 1 PUNTO por cada comprimido consumido.
- Mometasona nasal: se valoró como 1 PUNTO por cada pulsación en cada una de las fosas nasales.
- Salbutamol: se valoró como 1 PUNTO por cada inhalación.
- Budesonida inhalada (200ug): se valoró como 2 PUNTOS por cada inhalación.
- Metilprednisolona: se valoró como 1 PUNTO por miligramo

Variables secundarias de eficacia

- **Escala visual analógica (EVA)**

Evaluada por el paciente y el investigador. Consiste en una línea horizontal de 100 mm, sin marcas o señales intermedias, en la que en el extremo izquierdo reflejaba el estado "MUY MAL" y el extremo derecho reflejaba el estado "MUY

BIEN". El paciente debía señalar mediante una cruz la situación en la evolución de su sintomatología clínica (se midió en las visitas basal, 2 y 3)

- **Prueba de provocación nasal**

Se realizó y valoró de acuerdo al protocolo habitualmente empleado en el Servicio de Alergia del Hospital. Evaluó los porcentajes de pacientes que daban positivo en cada concentración y tratamiento (30, 3, 03 y 0,03 HEP/ml). Fue realizada en la visita basal y en la V4.

- **Cuestionarios de calidad de vida en rinitis (RQLQ)**

Se empleó el cuestionario de calidad de vida en rinoconjuntivitis, desarrollado por Juniper y cols, 1993¹⁷⁷, cuya traducción al español fue subministrada por la propia autora. Dicha traducción al español se encuentra validada (Soler y cols, 2004¹⁷⁸).

El cuestionario RQLQ consta de 28 preguntas (ítems) distribuidas en 7 dominios (limitación de actividad, alteración del sueño, síntomas generales, problemas prácticos, síntomas nasales, síntomas oculares y estado emocional). Los pacientes tuvieron que recordar el grado de molestias producidas por la rinoconjuntivitis durante la semana anterior y tuvieron que responder a cada ítem

¹⁷⁷ Juniper EF, Thompson AK, Ferrie PJ, Roberts JN. Validation of the standardized version of the rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104 (2 Pt 1): 364-369.

¹⁷⁸ Soler, R., Badia, X., Mercadal, J., Lozano, R., & Benavides, Validación de la versión española del cuestionario de calidad de vida para pacientes con rinoconjuntivitis. *Rev Clin Esp* 2015; 204(3), 131–138.

en una escala de 6 puntos (0 = no ha molestado nada; hasta 6 = ha molestado muchísimo).

La puntuación global en el cuestionario RQLQ fue la media de todos los ítems y las puntuaciones de los dominios individuales fueron las medias obtenidas en cada dominio. La media de todos los ítems tuvo el mismo rango, de 0 a 6.

El cuestionario fue entregado a los pacientes en las visitas basal y 3. Se comparó la diferencia de las puntuaciones entre la visita 3 y la visita basal entre los tres tratamientos, tanto a nivel global como para las diferentes subescalas (actividades, sueño, síntomas generales, problemas prácticos, nariz, ojos, emocional). Las puntuaciones en las dos visitas se compararon también para cada grupo por separado.

Cuestionarios de calidad de vida en asma (AQLQ)

Se empleó el cuestionario de calidad de vida en asma, desarrollado por Marks y cols.1992, y validado en español (Perpiña y cols, 1995¹⁷⁹). El cuestionario refleja aspectos funcionales importantes de los pacientes asmáticos, incluye aspectos tanto emocionales como físicos, es reproducible cuando el estado clínico es estable, es sensible a los cambios importantes en el paciente, incluso cuando estos son pequeños, es válido y realmente mide la calidad de vida en asma.

¹⁷⁹ PERPIÑÁ M, BELLOCH A, PASCUAL LM, DE DIEGO A, COMPTE L. THE QUALITY OF LIFE IN ASTHMA: AN EVALUATION OF THE AQLQ QUESTIONNAIRE FOR ITS USE ON A SPANISH POPULATION. ASTHMA QUALITY OF LIFE QUESTIONNAIRE. ARCH BRONCONEUMOL. 1995 MAY; 31(5):211-8.

Para el cuestionario AQLQ, se comparó la diferencia de las puntuaciones entre la visita 3 y la visita 1 entre los tres tratamientos a nivel global en la población ITT. Las puntuaciones en las dos visitas se compararon también para cada grupo por separado. La puntuación del cuestionario AQLQ para cada paciente fue la media de todos los ítems (agrupados en 4 dimensiones: ahogo, estado de ánimo, restricción social y preocupación). Cada ítem tomó un valor de 0 a 6; 0 indicando que el problema descrito en el ítem no había molestado nada y 6 que había molestado muchísimo. La media de todos los ítems tiene el mismo rango, de 0 a 6.

Los resultados del cuestionario de calidad de vida para el asma (AQLQ) no se tuvieron en cuenta en el informe estadístico final, dado que se rellenaron por todos los pacientes y no solo por los asmáticos.

Parámetros inmunoserológicos y citocinas

- **Cuantificación de inmunoglobulinas**

A todos los pacientes del estudio se les tomó una muestra de sangre venosa en tubo sin anticoagulante, durante la visita basal y la visita final, y se cuantificaron las concentraciones de los anticuerpos específicos de alérgeno en suero para: IgE específica frente a *Phleum pratense*, IgG específica frente a *Phleum pratense* e IgG4 específica frente a *Phleum pratense*, así como IgE total mediante la técnica enzimoimmunoensayo (ver figura 5) siguiendo las indicaciones del fabricante (Phadia ImmunoCAP 250, Uppsala, Suecia).

El ImmunoCAP es una prueba *in vitro* para la cuantificación de inmunoglobulinas circulantes en muestras de suero humano. La técnica que usa el ImmunoCAP 250 está basada en un fluoroenzimoimmunoensayo (ver figura 5), en el que los anticuerpos que se van a evaluar) (anti-IgE total, anti-IgE específica frente a *Phleum pratense*, IgG específica frente a *Phleum pratense* e IgG4 específica frente a *Phleum pratense*) están unidos covalentemente a los pocillos del ImmunoCAP, en donde reaccionan con la inmunoglobulina en cuestión (IgE, IgG, IgG4) del suero del paciente.

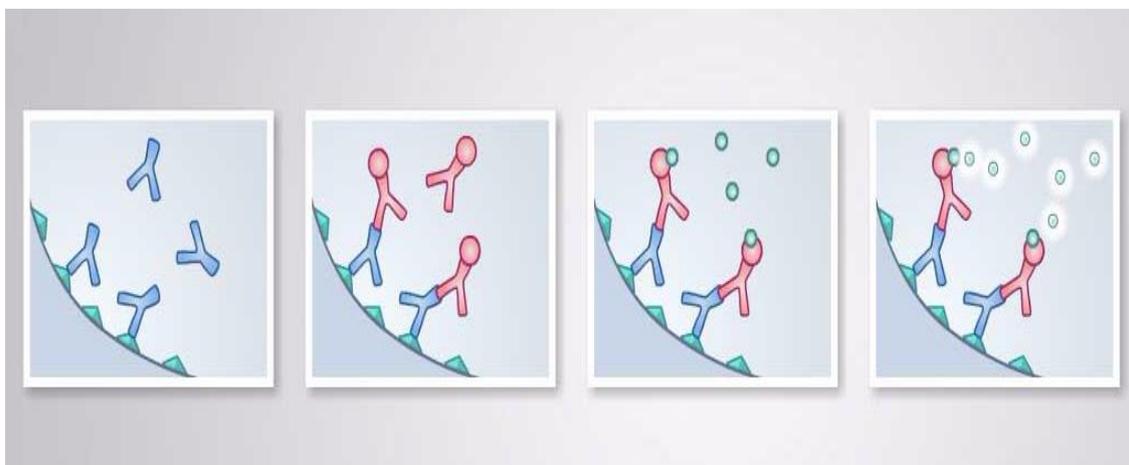


Figura 5. Determinación de IgE. ImmunoCAP 250 (Phadia, Sweden Diagnostics).

Después de eliminar los anticuerpos no unidos se añaden anticuerpos marcados con enzimas dirigidos contra anticuerpos IgE o IgG humanos (β -galactosidasa-anti-IgE, β -galactosidasa-anti-IgG anticuerpos monoclonales de ratón, 2 μ l/ml) y se forma un complejo con la IgE o IgG del suero. Posteriormente a la incubación, las enzimas no unidas son removidas a través del lavado y el complejo final es incubado con la solución de desarrollo. Tras la incubación se añade una solución stop para detener la reacción, y posteriormente se mide la fluorescencia del

eluido. Para evaluar los resultados de las pruebas, las unidades de respuesta se transforman en concentraciones utilizando una curva patrón.

- **Cuantificación de citocinas**

A todos los pacientes del estudio se les tomó una muestra de sangre venosa en tubo sin anticoagulante, durante la visita basal (VB) y la visita final (V4), y se determinaron los niveles de citocinas. Las citocinas estudiadas fueron: IL-2, IL4, IL5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN- γ y TNF- α .

Se realizó mediante el sistema Bio-Plex 200 (citocinas) ver figura 6.



Figura 6. Bio-Plex 200

El Bio-Plex es un sistema de análisis múltiple, analiza simultáneamente hasta 100 biomoléculas diferentes (proteínas, péptidos, o ácidos nucleicos) en un solo pocillo de la microplaca. La plataforma de microplacas permite el análisis automatizado de placas de 96 pocillos con un rendimiento de más de 1800 puntos de ensayo en media hora.

Este sistema se basa en 3 tecnologías:

1. Microesferas teñidas por fluorescencia.
2. Un citómetro de flujo con dos láseres y óptica asociados para medir las reacciones bioquímicas que se producen en la superficie de las microesferas.
3. Un procesador de señal digital de alta velocidad para realizar eficientemente la emisión de fluorescencia.

Dentro de sus aplicaciones están los perfiles de expresión de la proteína, citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, marcadores cardíacos, marcadores de cáncer, marcadores metabólicos, tipificación, etc. También a nivel de investigación Genómica con los genotipados, perfiles de expresión génica, enfermedades genéticas, fibrosis quística etc., y por último en inmunodiagnóstico para pruebas de alergia, enfermedades autoinmunes, pruebas de HLA y enfermedades infecciosas.

Procedimiento

Inicialmente se descongelaron las muestras para reconstituir los estándares, una vez descongelados se colocaron en hielo en gradillas. Mientras se descongelaban se reconstituyó el frasco de Standard liofilizado con 500 ul de *Standard Diluent*, invirtiéndolo en varias ocasiones (3) y dejándolo en hielo por 30 minutos con agitación ocasional.

Preparación de las muestras

En una placa de 96 pocillos (colocada en gradilla fría) se cargó cada pocillo con 120 ul de diluyente, posteriormente se adicionaron 40 ul de los sueros a evaluar, a continuación vórtex, y de esta mezcla se tomaron 50 ul que se depositaron posteriormente en la placa que contenía las microesferas, se cubrió la placa, se colocó en agitador horizontal a temperatura ambiente a una velocidad máxima (1100 rpm) durante 30 segundos, y se bajó la velocidad a velocidad moderada (300 rpm) durante 30 min.

Al terminar la incubación se retiró del agitador y se trasladó a la estación de lavado donde se realizaron 3 lavados con el programa MAG3X, cuando dio la señal se retiró la placa y se realizó un nuevo lavado. Posteriormente a estos lavados se adicionó a cada pocillo 25 ul de la dilución para detectar anticuerpos (1X *Detection Antibody*), se cubrió nuevamente la placa y llevó al agitador por 30 segundos a velocidad máxima y 30 minutos a velocidad moderada para una segunda incubación.

Una vez terminada la segunda incubación se abrió nuevamente la placa y se realizó un nuevo lavado con el programa MAC3X. Cuando dio la señal se sacó la placa y se lavó con solución de lavado, se añadieron 50 ul de la solución de estreptavidina 1 X a cada pocillo y se cubrió nuevamente, se colocó en agitador 30 segundos a velocidad máxima y 10 minutos a velocidad moderada para una última incubación. Al finalizar los 10 minutos se descubrió la placa y se colocó en la estación de lavado en el programa MAC3, una vez terminado se extrajo la placa y se lavó nuevamente.

Finalmente, se añadieron 125 µl de tampón de ensayo a cada pocillo, se cubrió la placa, se agitó a temperatura ambiente 30 segundos a velocidad máxima, se retiró la cubierta y se colocó la placa en el lector y se procedió a la lectura de la placa¹⁸⁰. Con el fin de tener valores validos se realizó diariamente calibraciones del equipo.

4.2 Análisis molecular

Preparación de muestras de ADN

Se obtuvo muestra de sangre periférica a los pacientes de la muestra genética, siendo recolectada en tubos con EDTA y posteriormente almacenada a -20°C hasta el momento de realizarse la extracción de ADN.

Extracción de ADN

Se utilizó el sistema “MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit” (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) ver figura 7, consistente en un sistema automatizado que extrae simultáneamente 8 muestras de ácidos nucleicos procedentes tanto de sangre total, plasma, suero o células en cultivo.

El ADN genómico extraído por este método se utilizó posteriormente para realizar las amplificaciones de las regiones génicas de interés mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este sistema realiza

¹⁸⁰ Información obtenida de PROTOCOLO NORMALIZADO DE TRABAJO Bio-Plex 200 – citokinas- Sección de Técnicas Moleculares, Servicio de Bioquímica Clínica. Hospital Universitario de Salamanca.

la extracción de ADN (ver figura 7) por medio de partículas magnéticas, que consta fundamentalmente de una serie de pocillos en los que se encuentran los reactivos de extracción. Las muestras son aspiradas por pipetas estériles que las pasan en pasos sucesivos a los diferentes pocillos que contienen los reactivos.

El proceso se inicia adicionando a la muestra un tampón de lisis para destruir las proteínas (contiene proteinasa K), detergente para lisar las membranas celulares (Tritón X-100) e inhibidores de desoxirribonucleasas y ribonucleasas. Se incuba a temperatura elevada y posteriormente se añade la solución que contiene partículas magnéticas e isopropanol para lograr aislar las moléculas de ácidos nucleicos unidos a las partículas.

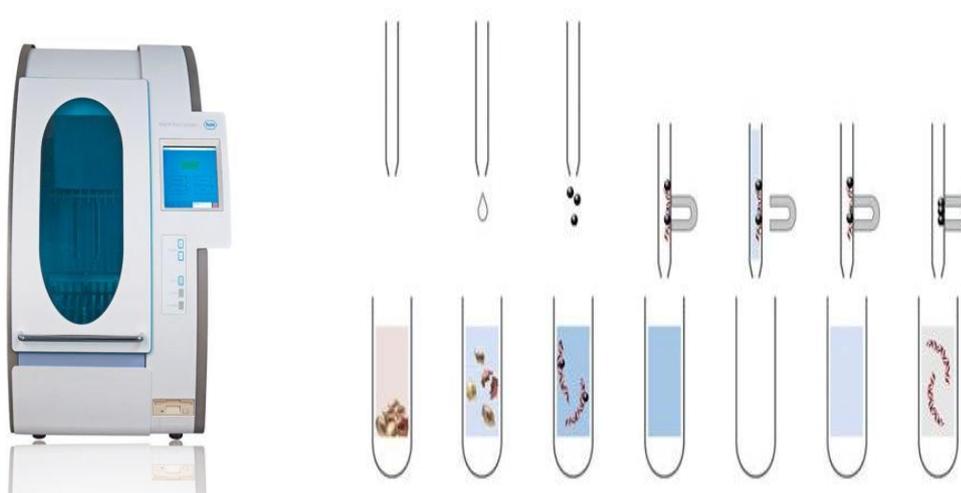


Figura 7. MagNA Pure Compact Instrument. Proceso de extracción ADN

Después de varios lavados con solución tampón de lavado y etanol a diferentes pH, el ADN se aísla de las partículas magnéticas por calor y elución final.

Cada extracción lleva los siguientes pasos:

- Los especímenes de sangre congeladas a -20°C se descongelaron gradualmente hasta alcanzar la temperatura ambiente.
- En el equipo de extracción de ADN se seleccionó el protocolo “DNA blood_1000”, para 1ml de muestra de sangre total y elución en un volumen final de 200 μl .
- Se introdujeron los pocillos con los reactivos tras la lectura del código de barras de cada muestra y las pipetas estériles.
- Se dispensó 1 ml de muestra en un criotubo identificado, siendo introducida la información en el ordenador del instrumento.
- Se cargó el equipo además con tubos de elución identificados cada uno con el número de muestra y leyendo el código de barras para evitar equivocaciones de identificación en el ordenador del instrumento.
- Finalmente se procedió a la extracción automática con una duración aproximada de treinta y cinco minutos.

Valoración del rendimiento de la extracción de ADN

En cada procedimiento molecular en el que se utilizó ADN se evaluó previamente la calidad y cantidad del ADN extraído para el análisis genético de polimorfismos múltiples; el rendimiento se evaluó mediante la determinación de la absorbancia a 260 y a 280nm en el espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). El volumen final para la medición de la absorbancia fue de 100 μl (2 μl de la muestra problema y 98 μL de agua destilada). La medida se realizó por triplicado, obteniendo la absorbancia a 260 nm y la ratio 260/280.

Genotipado

Se evaluaron 22 polimorfismos de 13 citocinas distintas en individuos. Los polimorfismos genotipados se describen en la tabla 5.

Sistema de Genotipado

Se realizó un sistema de genotipado múltiple mediante el sistema “*Cytokine genotyping*”, elaborado por el Departamento de Inmunología de la Universidad de Heidelberg (Alemania), comercializado por Invitrogen™ (DeerbrookTrail, USA) y certificado por la Comunidad Europea de acuerdo a los requerimientos de la Directiva para el Diagnóstico In Vitro 98/79/EC. Este sistema consiste en la realización de PCR utilizando cebadores específicos de alelo SSP-PCR (*sequence specific primers polymerase chain reaction*) que permite el análisis de mutaciones conocidas, en donde el nucleótido del extremo 3' es complementario a una de las variantes del sitio polimórfico que se va a estudiar del ADN molde de la muestra¹⁸¹ ver figura 8. El cebador se extenderá cuando el extremo 3' se complemente con el ADN molde de la muestra.

Para el genotipado de cada polimorfismo se realizaron dos reacciones de PCR independiente, empleando para cada reacción un cebador específico de alelo diferente y compartiendo un cebador diseñado para unirse a una región invariable. El amplificado mostrará el cambio revelado por el cebador específico del alelo utilizado.

¹⁸¹Newton, C.R., et al., Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucl. Acids Res., 1989. **17**(7): p. 2503-2516.

Tabla 5. Descripción de los genes objeto de estudio y de los SNP analizados en cada gen.

GEN	Identificación NCBI	NOMBRE (<i>Heidelberg system</i>)
IL1A	rs 1800587	<i>IL-1A -889 C>T</i>
IL1B	rs 16944	<i>IL-1B -511 C>T</i>
	rs 1143634	<i>IL-1B 3954 C>T (IL-1B 3962)</i>
IL1R1	rs 2234650	<i>IL-1R1 pstI A C>T (IL-1R1 pstI 1970)</i>
IL1RN	rs 315952	<i>IL-1RN pos 30,735 T>C IL-1RN mspal</i>
IL2	rs 2069762	<i>IL-2 -714 T>G(IL-2 -330)</i>
	rs 2069763	<i>IL-2 114 G>T (IL-2 166)</i>
IL4	rs 22432484	<i>IL-4 -1098 T>G</i>
	rs 2243250	<i>IL-4 -589 C>T (IL-4 -590)</i>
	rs 2070874	<i>IL-4 -33 C>T</i>
IL4R	rs 1801275	<i>IL-4R Gln221Arg A>G(IL-4R 1092)</i>
IL6	rs 1800795	<i>IL-6 -174 G>C</i>
	rs 1800797	<i>IL-6 -597 G>A (IL-6 nt565)</i>
IL10	rs 1800872	<i>IL-10-592 C>A</i>
	rs 1800871	<i>IL-10 -819 C>T</i>
	rs 1800896	<i>IL-10 -1082 A>G</i>
IL12B	rs 3212227	<i>IL-12B pos 1188 A>C (IL-12B -1188)</i>
IFNG	rs 2430561	<i>IFN-G 874 A>T</i>
TGFB1	rs 1982073	<i>TGFB-1 869 T>C (TGFB-1 codon 10)</i>
	rs 1800471	<i>TGFB-1 915 G>C (TGFB-1 codon 25)</i>
TNFA	rs 361525	<i>TNF-A -238 G>A</i>
	rs 1800629	<i>TNF-A -308 G>A</i>

Cada uno de los pocillos de la placa de PCR para citocinas contiene una mezcla específica de oligonucleótidos liofilizados. En un total de 48 pocillos se evaluaron 22 polimorfismos, que contiene individualmente una pareja de oligonucleótidos

específicos de uno de los alelos, además de un control de amplificación positiva: que incluye un fragmento de 89 pb del gen de la β -globina en los pocillos de los 93 polimorfismos de *IL-2*, *IL-4*, *IL-6* e *IL-10*; y otro fragmento de 440 pb del gen de la proteína C reactiva humana en el resto de los pocillos.

Amplificación del ADN

Inicialmente se descongelaron las muestras de ADN y dos viales de tampón de reacción (con el fin de genotipar simultáneamente 2 pacientes, dado que la placa lo permite) en gradillas de frío, y se preparó la mezcla de reacción con los elementos indicados en la tabla 6.

De acuerdo al rendimiento obtenido en las extracciones de ADN se calculó la cantidad de ADN a utilizar en cada muestra, ajustando la cantidad de ADN por paciente de forma que se emplearon aproximadamente 7,5 μg totales de ADN para las 48 reacciones en un volumen de 75 μl de ADN (con una concentración entre 75-125 $\text{ng}/\mu\text{l}$ de ADN) y se completó un volumen final de 525 μl con agua destilada.

Los integrantes de la PCR se añadieron en el siguiente orden:

- ✓ Agua destilada libre de desoxirribonucleasas.
- ✓ Tampón de reacción (Buffer GL Plus Invitrogen, actualmente Thermo Fisher SCIENTIFIC, Waltham, Massachusetts, USA).
- ✓ Muestra de ADN.

- ✓ Polimerasa (la polimerasa se mantuvo a -20°C hasta el momento de ser añadida a la mezcla de reacción).

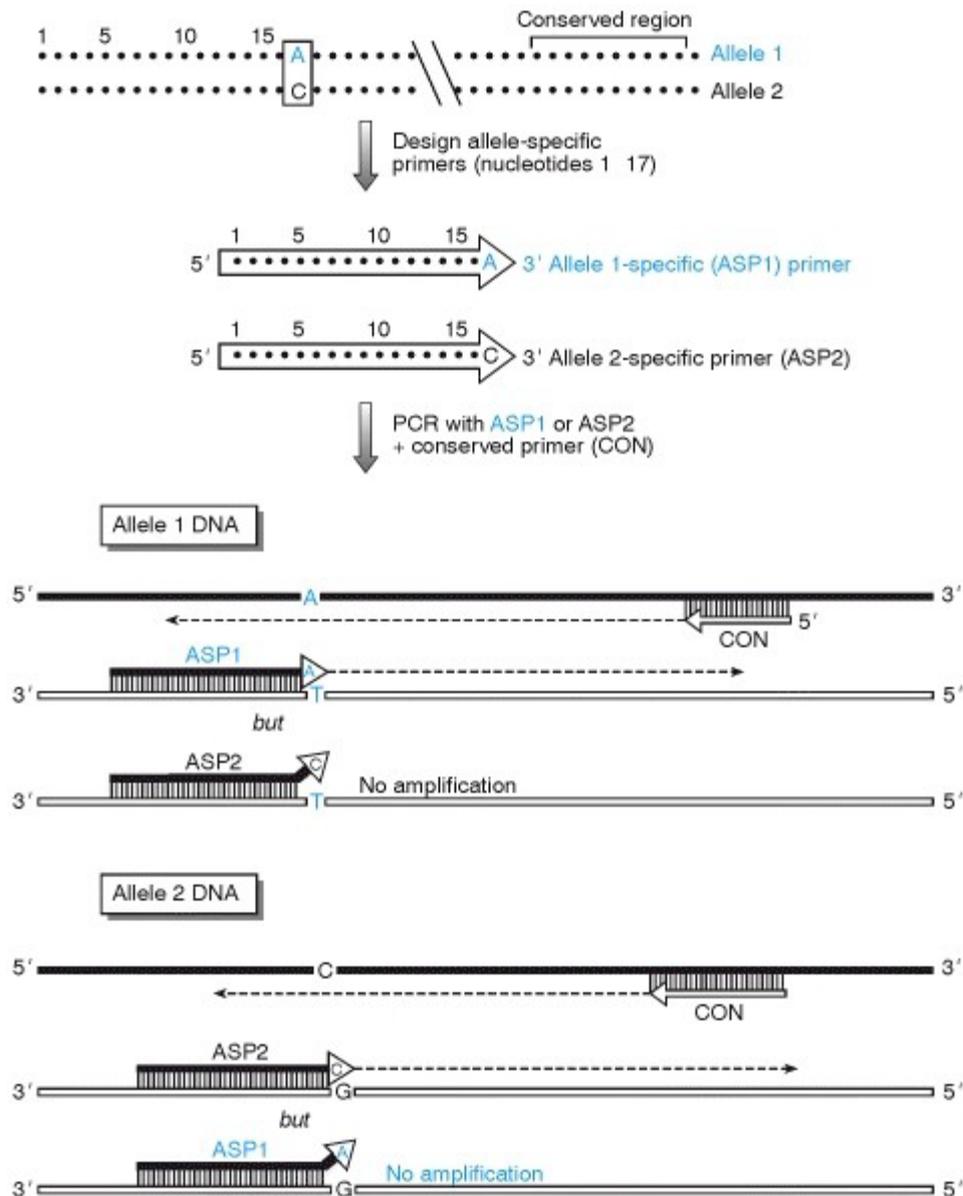


Figura 8. SSP-PCR (Tomado de Human Molecular Genetics 2, Tom Strachan y Andrew P. Reader (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=hmg>))

Cada placa contiene 96 pocillos permitiendo así genotipar a la vez dos individuos. Como tampón de reacción se utilizó el subministrado por el fabricante además en cada reacción se empleó la ADN polimerasa Fast Start Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostics, Manheim, Alemania), cuya propiedad es ser termoestable (permanece

inactiva a temperaturas menores de 75°C y activarse a 95°C), modificada a partir de la polimerasa recombinante de *Thermus aquaticus*¹⁸².

Tabla 6. Elementos de la *master mix*

TAMPÓN DE REACCIÓN	<i>FastStart Taq</i> DNA <i>polymerase</i>	Agua destilada	ADN	Volumen final
140 µl	4 µl	306 µl	75 µl	525 µl

Todo el procedimiento se realizó en un tubo *ependorf* estéril en gradilla fría y pertinentemente identificado con el número de laboratorio de cada muestra de ADN. Se realizó la mezcla con un agitador tipo “vórtex” y luego un *spin* (toque de centrifuga). Se dispensaron 10 µl de la mezcla de reacción en cada uno de los pocillos de la placa de PCR (la que se encontraba en el congelador, siendo ubicada en una gradilla fría), se selló y se insertó en un termociclador T Professional 96 Thermocycler Whatman Biometra®, (Goettingen, Alemania), el programa de amplificación empleado se indica en la tabla 7.

Visualización de los resultados

Para la visualización de los resultados, los productos de la PCR obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa de alta resolución al 2%. La Agarosa utilizada fue NuSieve® 3:1 Agarose (Cambrex Bio

¹⁸²PCR Application Manual. 2nd ed, ed. R.M. Diagnostics. 1999

Science Rockland, Inc, EEUU) y Tampón TAE (Tris-Acético-EDTA) al 0,5X, siendo preparada a partir de una solución TAE Buffer 10X (Promega, Madison, USA), formada por 400 mM de Tris-acetato y 10 mM de EDTA a pH 8,2-8,4.

A lo largo del estudio el TAE fue remplazado por TBE (Tris-Bórico-EDTA) al 0,5X por su mejor capacidad en la separación de fragmentos pequeños de ADN (100-500pb), su preparación fue a partir de una solución madre TBE Buffer 10X (Promega, Madison, USA) compuesta por 890 mM de Tris-bórico, 890mM de ácido bórico y 20 mM de EDTA.

Tabla 7. Programa de PCR utilizado

PROCEDIMIENTO	CICLOS	TIEMPO	TEMPERATURA
ACTIVACIÓN		4min	94°C
DESNATURALIZACIÓN	10X	30seg	94°C
1ª ELONGACIÓN	10X	60seg	65°C
DESNATURALIZACIÓN	20X	30seg	94°C
2ª ELONGACIÓN	20X	50seg	65°C
ELONGACIÓN FINAL		60seg	72°C
CONSERVACIÓN			8°C

Para la realización del gel en un matraz se adicionó la agarosa con TAE 0,5X y se llevó al horno microondas hasta disolverse completamente, se dejó enfriar y en cuanto se enfrió, se añadió GelRed (INTRON BIOTECHNOLOGY, Houston, Texas, USA), concretamente 6 µl de GelRed por cada 300 µl de buffer, vertiéndose posteriormente en una cubeta de electroforesis. La finalidad de adicionar GelRed es que se intercala entre las hebras de ADN y al ser iluminado con luz ultravioleta emite fluorescencia permitiendo visualizar la presencia de

ácidos nucleicos en el gel. Se cargan los pocillos del gel luego de estar solidificado con 10 μ L de los productos de la PCR. El tampón de carga (Buffer GL Plus) contiene glicerol y un colorante, el glicerol permite que las muestras cargadas se desplacen al fondo del pocillo, y el colorante observar la migración de las muestras en el gel.

Como marcador de peso molecular se utilizó el *DNA Molecular Weight Marker VIII* (Roche Applied Science, Manheim, Alemania), cuyo patrón de bandas varia en un rango de tamaños de 1114 pb a 67 pb (ver figura 9).

La electroforesis se llevó a cabo utilizando el mismo tampón que para la preparación del gel, a 180 Voltios durante aproximadamente 30 minutos, posteriormente el gel se visualizó con un transiluminador de luz ultravioleta para ser interpretados con el sistema fotográfico VisiDoc-It™ Imaging System (Uplant, CA, USA).

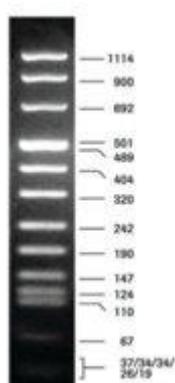


Figura 9. Patrón de bandas del Marker VIII en un gel de agarosa al 2%.

En la figura 10 se aprecia el resultado de la amplificación de la electroforesis de los 22 polimorfismos correspondiente a la muestra de ADN de un paciente.

Interpretación de los resultados

Para la interpretación de los resultados se utilizó la plantilla suministrada por el fabricante (Véase figura 11) que relaciona la posición de la reacción de PCR con el alelo del polimorfismo que se va a estudiar.

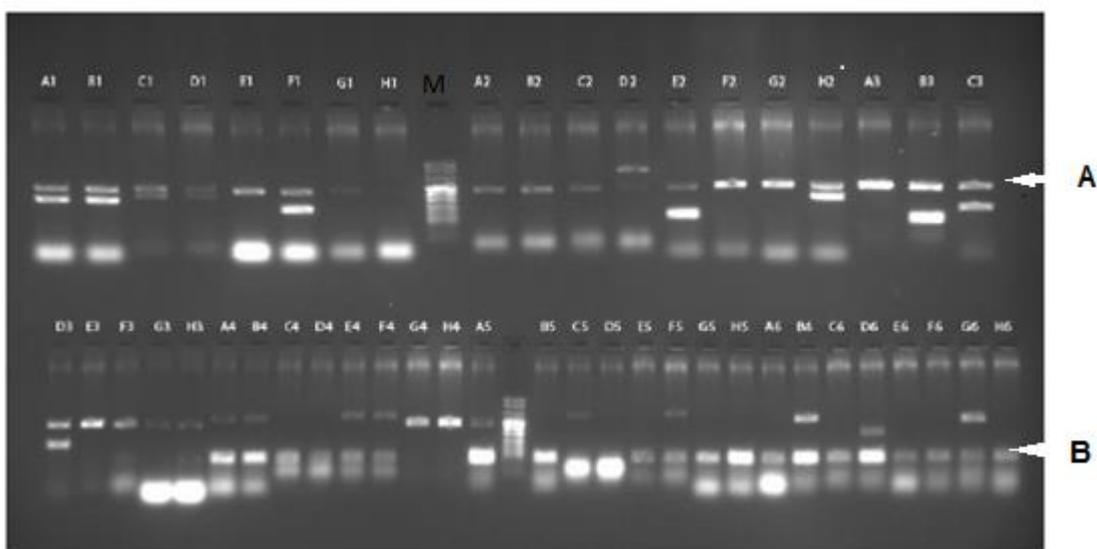


Figura 10. Visualización con luz UV de un gel de electroforesis. **M:** marcador de peso molecular. **A** representa el control 440 pb. **B** representa el control 89 pb.

A lo largo de este estudio, el distribuidor como mejora cambió el tamaño de la banda producto para el snp del *IFN γ* , pasó a ser de 180 pb, el resto de SNP conservaron el mismo tamaño de la banda producto. Finalizada la electroforesis se fotografió y se analizó la imagen mediante un programa gráfico.

Para cada carrera del gel se revisó y determinó si era positiva, negativa o no concluyente, de acuerdo a los siguientes criterios:

- ✓ Presencia de banda control de 89 pb (banda B en la figura 10) en las carreras de los polimorfismos de *IL2*, *IL4*, *IL6* e *IL10* y de 440 pb (banda A en la figura 10) en las carreras de los polimorfismos de *IL1A*, *IL1B*, *IL1R*, *IL1RA*, *IL4RA*, *IL12*, *IFNG*, *TGFB* y *TNFA*. Para la evaluación de esta banda se tuvieron en cuenta las recomendaciones del fabricante, que sugerían que las bandas control podrían aparecer muy tenues si la amplificación de la banda del polimorfismo era muy clara debido a un fenómeno de competición por sustrato.

	1	2	3	4	5	6
A	IL-1R T/1970 288	g-IFN T/374 277	TNFA A/-308//G/-238 110	IL4 T/-1098//C/-590 557	IL6 C/-174//G565 426	IL10 A/-1082//A/-592 530
B	IL-1R C/1970 288	g-IFN A/374 277	TNFA G/-308//G/-238 110	IL4 T/-1098//T/-590 557	IL6 G/-174//G565 427	IL10 A/-1082//C/-592 530
C	IL-1b C/+3962 336	IL-12 A/-1188 802	TGFb1 T/10 195	IL2 T/-330//T/166 569	IL4 C/-590//C/-33 610	IL10 A/-1082//T/-819 305
D	IL-1b T/+3962 336	IL-12 C/-1188 802	TGFb1 C/10 195	IL2 G/-330//T/166 569	IL4 C/-590//T/-33 610	IL10 A/-1082//C/-819 305
E	IL-1b T/-511 215	IL-4Ra A/1902 143	TGFb1 T/10-C/25 80	IL2 G/-330//G/166 564	IL4 T/-590//C/-33 610	IL10 G/-1082//C/-592 530
F	IL-1b C/-511 215	IL-4Ra G/1902 143	TGFb1 T/10-G/25 80	IL2 T/-330//G/166 562	IL4 T/-590//T/-33 610	IL10 G/-1082//C/-819 305
G	IL-1a C/-889 220	IL-1RA C/11100 297	TGFb1 C/10-C/25 80	TNFA A/-308//A/-238 110	IL4 G/-1098//C/-590 557	IL6 C/-174//A/565 428
H	IL-1a T/-889 220	IL-1RA T/11100 297	TGFb1 C/10-G/25 80	TNFA G/-308//A/-238 110	IL4 G/-1098//T/-590 557	IL6 G/-174//A/565 428
		Control 440pb				
		Control 89				

Figura 11. Plantilla de interpretación de resultados: cada casilla corresponde a una coordenada de la placa de PCR. En ella se muestra el alelo que amplifica, así como el tamaño en pares de bases de la banda producto. El tamaño de la banda control es de 440 pb (área sombreada) o de 89 pb (áreas en blanco).

- ✓ Evaluación de la presencia o ausencia de la banda específica de cada polimorfismo y comprobación de su tamaño.
- ✓ Evaluación de la presencia de otras bandas de tamaño diferente al esperado.

La amplificación se consideró positiva cuando podía observarse en la carrera de electroforesis la banda específica del polimorfismo en cuestión con el tamaño correspondiente (indicada en la casilla en pb), además de la banda control (ver figura 12.).

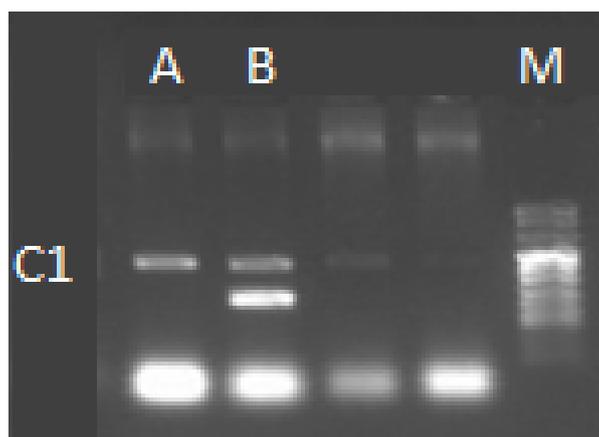


Figura 12. A: resultado de una amplificación negativa, ya que se observa una banda control de 440pb (**C1**), pero no se observa la banda problema, que en ese caso debería tener 215pb. **B:** consideramos la amplificación positiva, ya que presenta tanto la banda control de 440pb como la banda problema de 215pb. **M:** marcador de peso molecular.

Se consideró negativa la amplificación (ver figura 12.) cuando en la carrera de electroforesis no se observó la banda específica del polimorfismo del tamaño

concreto, independientemente de la presencia o no de otra banda de diferente tamaño, pero sí se observó la banda control correspondiente.

No concluyente se determinó en aquellas reacciones en las que no se observaba la banda control y la banda problema era muy leve o no se apreciaba, quedando ese polimorfismo sin genotipar (ver figura 13).

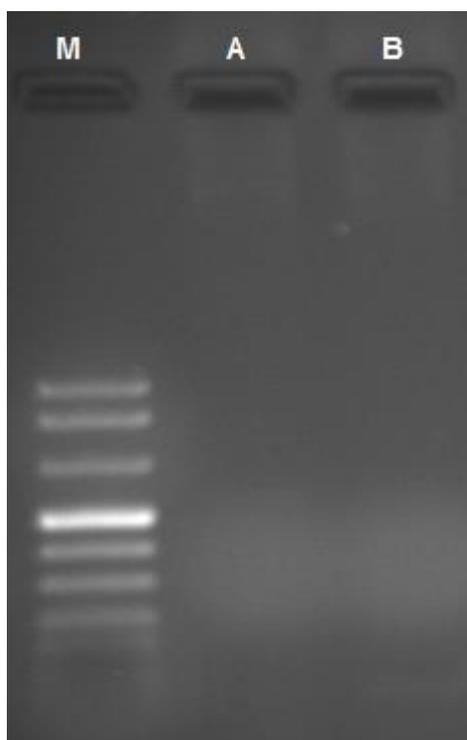


Figura 13. No se observan ni las bandas control ni las bandas problema, por lo que se considera que ha habido un fallo de amplificación y se determina que el resultado es no concluyente. **M:** marcador de peso molecular

La presencia de un genotipo determinado en un locus se precisó examinando todas las reacciones relativas a dicho locus, verificando que fuesen coherentes y que en ninguna de ellas se hubiese obtenido un resultado no concluyente (ver figura 14).

El genotipo de los polimorfismos se fue analizando en el gel y registrado los resultados en la hoja de interpretación y a partir de esta, fueron registrados en una base de datos del paquete estadístico SPSS 19.0 (IBM, Chicago, Illinois).

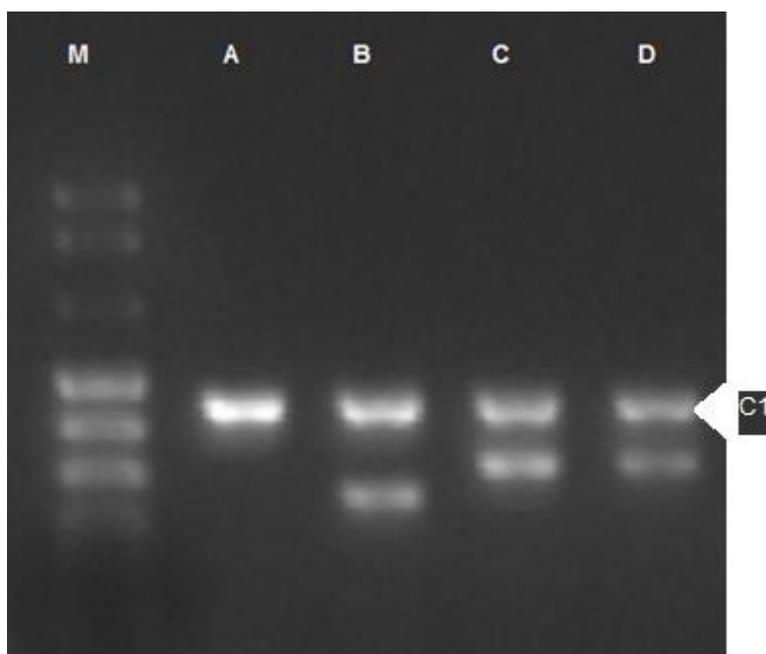


Figura 14. En esta figura se muestra en los carriles **A** y **B** las reacciones de amplificación del polimorfismo 1971 T>C de *IL1R*. El pocillo **A** representa la mezcla de oligonucleótidos específica del alelo T y el pocillo **B** la mezcla específica del alelo C. En ambos casos, se observa la presencia de la banda control de 440 pb, pero la banda específica de amplificación, de 288 pb solo se observa en el carril **B**, por lo que debe interpretarse que el genotipo de este paciente para este polimorfismo es homocigoto mutado CC. En los carriles C y D se muestran las reacciones de amplificación correspondientes al polimorfismo 3962 C/T de *IL1b*. El pocillo C representa la mezcla de oligonucleótidos específica del alelo C y el pocillo D la mezcla específica del alelo T. Se observa banda control de 440 pb en ambos, además de la banda problema de 336 pb, por lo que debe interpretarse que éste individuo es

heterocigoto C T para este polimorfismo. **M**: marcador de peso molecular. **C1**: banda de control 440pb.

Interpretación de los haplotipos

Este sistema de genotipado de citocinas, además de polimorfismos aislados, permite establecer haplotipos, porque en algunos pocillos lleva oligonucleótidos específicos para dos polimorfismos del mismo gen con diferente posición. En su interpretación, se tuvo presente los resultados logrados en la amplificación de todos los pocillos asociados al gen (véase un ejemplo en la figura 15 y su interpretación en la tabla 8).

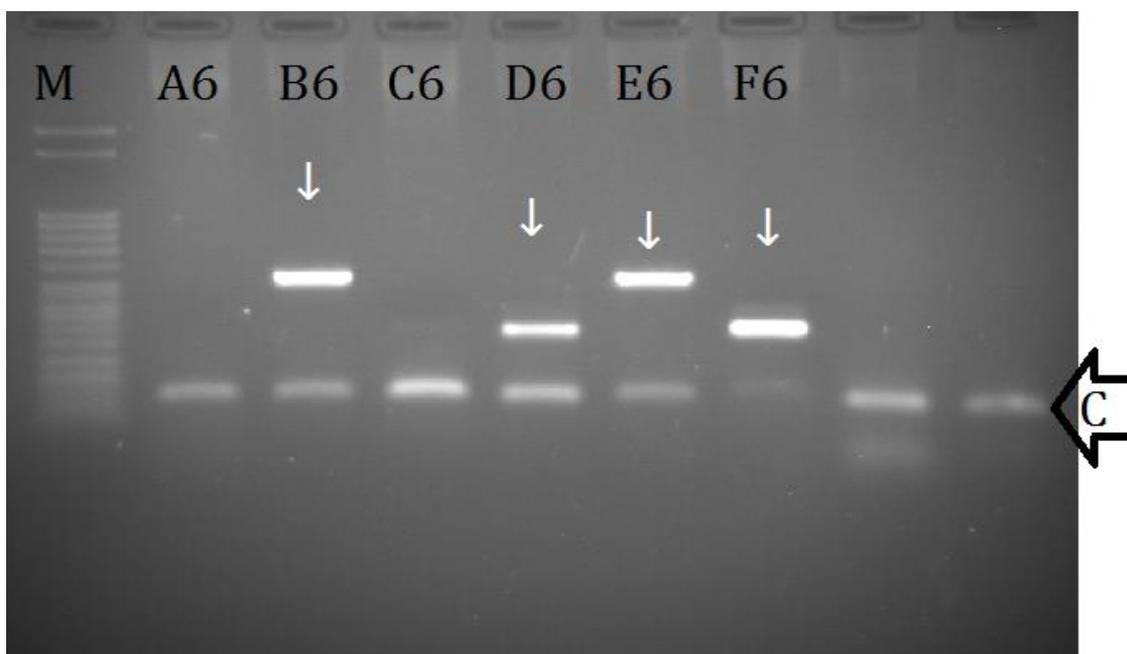


Figura 15. Esta imagen muestra el resultado de la amplificación de los tres polimorfismos estudiados en el gen de IL-10. En el carril M se observa el marcador de peso molecular; en el carril A6 hay oligonucleótidos específicos para el alelo A en

posición -1082 y el alelo A en posición -592; el carril B6 para el alelo A -1082 y C -592; en el carril C6 para el alelo A -1082 y T -819; en el carril D6 para el alelo A -1082 y C -819; en el carril E6 para el alelo G -1082 y C -592; en el carril F6 para el alelo G -1082 y C-819. En todos los pocillos se observa la banda C (control) de 89 pb (flecha horizontal), por lo que el genotipado se considera correcto. Además, se observan bandas problema en los carriles B6 (530pb), D6 (305pb), E6 (530pb) y F6 (305pb) (flechas verticales). La presencia de estas bandas se interpretó según la figura 11.

Tabla 8. Resultado del genotipado del haplotipo del paciente, que en este caso es **IL-10 -1082,-819,-519 ACC/GCC**.

AMPLICIÓN	pos -1082	pos -819	pos -592
B 6	A		C
D 6	A	C	
E 6	G		C
F 6	G	C	

El análisis de los haplotipos y diplotipos se realizó a todos los pacientes. Los haplotipos estudiados se reportan en la tabla 9.

Control de calidad

Se siguieron todas las recomendaciones de la European Molecular Genetics Quality Network (EMQN)¹⁸³ para realizar los procedimientos analíticos. Las muestras recolectadas en el servicio de InmunoAlergia se identificaban

¹⁸³Patton S, S.S., *Draft Best Practice Guidelines for Laboratory Internal Quality Control*. European Molecular Genetics Quality Network, 2002.

inmediatamente con un código de barras una vez en el laboratorio, cada tubo de muestra fue identificado con un número de identificación de laboratorio, y la información correspondiente al paciente fue introducida en una base de datos almacenada en un ordenador con acceso restringido y sin incluir información personal identificativa. Con respecto al número de laboratorio, se utiliza una nomenclatura alfanumérica para evitar posibles errores derivados de la utilización exclusiva de números.

Tabla 9. Haplotipos estudiados

CITOCINAS	Alelos específicos/ posición 1	Alelos específicos/ posición 2	Alelos específicos/ posición 3
IL-1B	T/-511	C/3962	
	C/-511	T/3962	
IL-2	T/-330	T/166	
	G/-330	G/166	
IL-4	T/-1098	C/-590	C/-33
	G/-1098	T/-590	T/-33
IL-6	C/-174	G/565	
	G/-174	A/565	
IL-10	A/-1082	T/-819	A/-592
	G/-1082	C/-819	C/-592
TGFB1	T/10	C/25	
	C/10	G/25	
TNF-A	A/-308	G/-238	
	G/-308	A/-238	

Posterior a la identificación de las muestras se alicuotaron en criotubos de 1 ml, siendo identificados con el número del laboratorio respectivo. Finalmente se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso en cajas codificadas con la serie de identificación de las muestras (A1, A2).

La extracción de ADN se realizó en un laboratorio exclusivo para la extracción de ADN, utilizando material estéril y puntas con filtro. El proceso de extracción de muestras se realizó utilizando un sistema automático (ver figura 7) que permitió minimizar las transferencias de tubo a tubo, además de contar con un sistema de códigos de barras que permitió mantener identificadas las muestras durante todo el proceso.

Los ensayos fueron realizados teniendo en cuenta al número de laboratorio, desconociendo en todo momento si la muestra que se estaba procesando pertenecía a un control o a un paciente.

La PCR se realizó en una cabina de flujo laminar esterilizada periódicamente con luz UV, utilizando pipetas automáticas exclusivas para esa actividad y puntas de pipeta con filtro de un solo uso. Los reactivos utilizados en este estudio fueron de fabricación comercial.

La valoración de los resultados, se realizó utilizando una plantilla que fue interpretada por duplicado. Las discrepancias entre las dos plantillas fueron confirmadas una tercera vez utilizando la imagen digital. Los resultados

obtenidos de las plantillas se almacenaron en una base de datos de un programa estadístico con los datos clínicos de los pacientes.

Análisis *IN SILICO*

En este estudio se analizaron 22 polimorfismos de 13 genes diferentes en individuos con unas características clínicas muy bien definidas como se indica en los criterios de inclusión. Las secuencias consenso para cada gen se obtuvieron a partir de las bases de datos científicas disponibles para cada una de las fases.

-Descripción del gen

Las características del gen se analizaron en la base de datos de GeneCard® (<http://www.genecards.org/>) (ver figura 17), una página web sustentada y mantenida por el *Weizmann Institute of Science* y por el *Crown Human Genome Center*. Esta base de datos aporta información acerca de genes humanos, los aspectos genómicos, proteómicos, transcriptómicos y funcionales.

Al realizar la búsqueda de un gen en particular, esta base de datos nos aportó entre otra información la proteína codificada por el gen, su expresión, las rutas metabólicas donde participa, el tamaño del gen, su organización (exones e intrones que los conforman, isoformas, tipo de *splicing*), su ubicación cromosómica, su ubicación en la hebra y funciones (ver figura 18). Todos los genes estudiados se buscaron e identificaron en esta página.

Conociendo la hebra de ADN donde se encuentra ubicado el gen es posible ubicar la posición del polimorfismo, debido a que la mayoría de veces las bases de datos aportan la secuencia de la hebra molde (sentido 5' → 3').

The image shows the GeneCards website interface. At the top, there is a navigation menu with links to GeneCardsSuite, MalaCards, LifeMap Discovery, PathCards, TGex, VarElect, GeneAnalytics, GeneALaCart, and GenesLikeMe. Below this is a dark blue header with the GeneCards logo and a search bar. The main content area is divided into several sections: a central section titled 'GeneCards®: The Human Gene Database' with a description and a search bar containing 'BTK'; a right-hand sidebar with 'GeneCardsSuite' and 'NGS Analysis Tools' (TGex, VarElect); 'Affiliated Databases' (MalaCards, LifeMap, PathCards, GeneLoc); and 'Analysis Tools' (GeneAnalytics, GeneALaCart, GenesLikeMe). The bottom of the page features a 'Jump to section for this gene:' section with links to various categories like Aliases, Disorders, Domains, Drugs, Expression, Function, Genomics, Localization, Orthologs, Paralogs, Pathways, Products, Proteins, Publications, Sources, Summaries, Transcripts, and Variants.

Figura 17. Página de presentación de Gene card.

4.3 Análisis estadísticos

Se aplicaron medidas centrales y de dispersión para la descripción de la muestra. Inicialmente se analizó la normalidad en la distribución de las variables cuantitativas mediante Kolmogorov-Smirnov para la selección de las pruebas paramétricas o no paramétricas según el caso. Se analizó también la homogeneidad de varianzas mediante el estadístico Levene previa a la aplicación de la ANOVA.

4.3.1 Análisis estadístico de la eficacia

Para el análisis estadístico de la eficacia en este estudio se realizaron las siguientes pruebas:

Summaries for IL10 Gene ?

Entrez Gene Summary for IL10 Gene

The protein encoded by this gene is a cytokine produced primarily by monocytes and to a lesser extent by lymphocytes. This cytokine has pleiotropic effects in immunoregulation and inflammation. It down-regulates the expression of Th1 cytokines, MHC class II Ags, and costimulatory molecules on macrophages. It also enhances B cell survival, proliferation, and antibody production. This cytokine can block NF-kappa B activity, and is involved in the regulation of the JAK-STAT signaling pathway. Knockout studies in mice suggested the function of this cytokine as an essential immunoregulator in the intestinal tract. Mutations in this gene are associated with an increased susceptibility to HIV-1 infection and rheumatoid arthritis. [provided by RefSeq, May 2011]

GeneCards Summary for IL10 Gene

IL10 (Interleukin 10) is a Protein Coding gene. Diseases associated with IL10 include [Graft-Versus-Host Disease](#), [Protection Against and Hiv-1](#). Among its related pathways are [Regulation of nuclear SMAD2/3 signaling](#) and [Immune System](#). GO annotations related to this gene include [cytokine activity](#) and [interleukin-10 receptor binding](#).

UniProtKB/Swiss-Prot for IL10 Gene [IL10_HUMAN,P22301](#)

Inhibits the synthesis of a number of cytokines, including IFN-gamma, IL-2, IL-3, TNF and GM-CSF produced by activated macrophages and by helper T-cells.

Gene Wiki entry for IL10 Gene

No data available for [Tocris Summary](#), [PharmGKB "VIP" Summary](#), [tRNAdb sequence ontologies](#) and [piRNA Summary](#) for [IL10 Gene](#)

Genomic Location for IL10 Gene

Chromosome: 1
Start: 206,767,602 bp from pter *End:* 206,774,607 bp from pter
Size: 7,006 bases *Orientation:* Minus strand

Genomic View for IL10 Gene

Genes around IL10 on UCSC Golden Path with [GeneCards custom track](#)

Cytogenetic band: 1q32.1 by [Ensembl](#) 1q32.1 by [Entrez Gene](#) 1q32.1 by [HGNC](#)

IL10 Gene in genomic location: bands according to [Ensembl](#), locations according to [GeneLoc](#) (and/or [Entrez Gene](#) and/or [Ensembl](#) if different)

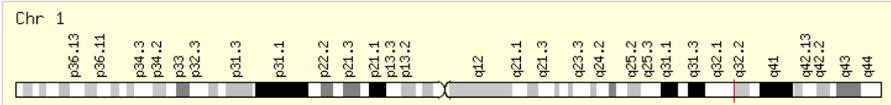


Figura 18. Apartes de la información acerca del gen de la *IL-10* arrojado por la base de datos Gene card.

El análisis de las puntuaciones medias de los síntomas y de la medicación (en forma global como por grupos) se llevó a cabo mediante la comparación de medias entre tratamientos usando el modelo estadístico paramétrico ANOVA.

Para el cuestionario RQLQ, se comparó la diferencia de las puntuaciones entre la visita 3 y la visita basal entre los tres tratamientos, tanto a nivel global como para las diferentes subescalas. Así mismo, se calculó la diferencia de medias entre los tratamientos de estudio y se puso a prueba la hipótesis de igualdad de

las diferencias entre los tres tratamientos (ANOVA). Los mismos análisis se realizaron para las subescalas de los cuestionarios. Con el fin de determinar si había asociación entre las dosis de tratamiento y la clínica, en cada subgrupo (G1, G2 y GP) se comparó las diferencia de las puntuaciones entre la visita 3 y la visita basal mediante la prueba para datos apareados (Test de Wilcoxon).

Los diferentes parámetros inmunoserológicos se compararon entre tratamientos respecto a la diferencia de sus valores entre el nivel basal y el final mediante la prueba estadística ANOVA.

Para cada tratamiento se compararon los niveles de los diferentes parámetros inmunoserológicos entre la visita basal y la final mediante la prueba "t" para datos apareados.

Para la prueba de provocación nasal se listó el número y el porcentaje de pruebas positivas a las concentraciones de 0,03, 0,3, 3 y 30 HEP/ml. Se realizó una comparación entre tratamientos de la proporción de pacientes que necesitaron una concentración más alta, más baja o igual para dar una respuesta positiva al final del estudio mediante la prueba de Chi cuadrado X^2 . Así mismo, para cada tratamiento, se cuantificó el cambio en la concentración del extracto del *Phleum* que producía una prueba de provocación nasal positiva entre el valor final y el valor basal mediante la prueba "t" para datos apareados.

4.3.2 Estudio estadístico de asociación genética entre casos y controles

- Análisis descriptivo

El análisis descriptivo de la población estudiada se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS 18.0 (IBM, Chicago, Illinois). En las variables cualitativas se calculó el porcentaje en los diferentes grupos establecidos, y el análisis de variables cuantitativas se realizó utilizando medidas de tendencia central media o mediana en función a las características de la variable.

- Análisis bivalente

El análisis estadístico se realizó comparando entre controles y pacientes la distribución alélica y genotípica de los diferentes polimorfismos con la finalidad de establecer una posible asociación genotipo- fenotípico. Las diferencias se establecieron a partir de un nivel de significación de $p\text{-Fisher} < 0,05$. Se tuvieron en cuenta los posibles sesgos en el análisis de comparaciones múltiples a través de la corrección de Bonferroni cuando fue necesario. Para el análisis combinado de variables cualitativas y cuantitativas se aplicó como se ha descrito previamente la ANOVA previa comparación de la homogeneidad de Varianzas o las pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis según la normalidad de la distribución de la muestra.

-Control estadístico

En aquellos casos en los que se encontró asociación estadísticamente significativa se llevó a cabo una regresión logística binaria utilizando el paquete

estadístico SPSS 19.0 (IBM, Chicago, Illinois), ajustado por edad y sexo, con el fin de determinar la influencia que tienen la edad y el sexo en la significación encontrada. Con el fin de evaluar el riesgo obtenido de las diferencias significativas se calculó el OR con un intervalo de confianza del 95%. Con ayuda de la plataforma on-line <http://statpages.org/proppowr.html> (Statistical Methods for Rates and Proportions por Joseph L. Fleiss (Segunda Edición., 1981, John Wiley & Sons, NY), capítulo 3) se calculó el poder estadístico de la asociación encontrada. Se realizó un análisis del poder estadístico sobre los resultados obtenidos estadísticamente significativos. También en los casos significativos se valoró la probabilidad de obtener un resultado falso positivo (FPRP) utilizando el método descrito por Wacholder y cols.

- Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas

Con la finalidad de determinar posibles diferencias en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas entre controles y los distintos grupos clínicos, se realizó la comparación de dichas frecuencias mediante un test de contingencia tipo X^2 (Chi cuadrado). Se realizó también el análisis del equilibrio de Hardy-Weimberg mediante una prueba X^2 .

Estas comparaciones se llevaron a cabo utilizando la plataforma estadística on-line SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>)¹⁸⁵.

¹⁸⁴ Shi, Y.Y. and L. He, *SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci*. Cell Res, 2005. 15(2): p. 97-98.

¹⁸⁵ Shi, Y.Y. and L. He, *SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci*. Cell Res, 2005. 15(2): p. 97-98.

- Análisis de haplotipos y diplotipos

Un haplotipo (haplo-gr. 'simple', 'sencillo' + *typo-gr. marca, forma; docum. En biología en ingl. Desde 1914 y en genética desde 1967*) se define como: "Conjunto de alelos localizados en una región pequeña del cromosoma, que tienden a heredarse como un bloque a través de un linaje. Los haplotipos marcan segmentos cromosómicos reconocibles que pueden seguirse a lo largo de los linajes y entre las poblaciones¹⁸⁶, entendiendo por "diplotipo" la pareja de haplotipos de un individuo diploide determinado.

En este estudio se determinó la asociación de los haplotipos y diplotipos de los genes *TNFA*, *TGFB*, *IL4*, *IL2*, *IL6* e *IL10* con los distintos rasgos clínicos de los pacientes. Se hizo uso de diferentes herramientas estadísticas: como primera plataforma estadística en línea SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>)¹⁸⁷, permitiendo comparar las frecuencias haplotípicas y su distribución entre controles y pacientes.

Y como segunda herramienta SPSS 18.0 (IBM, Chicago, Illinois). Se utilizó para determinar la posible influencia de la presencia de un diplotipo particular en las diferentes patologías en estudio.

¹⁸⁶Diccionario de términos médicos. Real Academia Nacional de Medicina Editorial Médica Panamericana 2012

¹⁸⁷ Li, Z., et al., *A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers: update of the SHEsis* (<http://analysis.bio-x.cn>). Cell Res. **19**(4): p. 519-523.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

En este estudio se han incluido un total de 403 individuos, en los que se han recogido 186 variables. Además, se han empleado dos grupos control: uno como control de genotipado y otro como control de inmunoterapia (que corresponde con el grupo placebo (GP). La distribución por sexos de dichos grupos se muestra en la figura 1.

5.1 Grupos integrantes del estudio

Grupo control para estudio de genotipado

Tras el cálculo predictivo del tamaño muestral se incluyeron 157 individuos en el grupo control con una mediana de edad de 50 años (R.I.= 33) y predominio de mujeres 63% (99 mujeres frente a 58 hombres) ver gráfico 1, y una media de IgE de 91,6 kU/L (D.E.: 175,9).

Grupo control para estudio de inmunoterapia

En el grupo control para el estudio de inmunoterapia, que se corresponde con el grupo GP, se incluyeron 24 pacientes con diagnóstico clínico de rinoconjuntivitis y /o asma alérgicas de carácter estacional debidas a hipersensibilidad al polen de *Phleum pratense*, que no recibieron inmunoterapia (IT). La media de edad del grupo control fue de 26,50 años (D.E.: 8,21) con predominio del sexo femenino

(62,5%) (Gráfico 1). Los niveles medios de *IgE* sérica total fueron de 278,70 kU/L (DE: 296,23). El porcentaje de asmáticos fue del 70,80%.



Figura 1. Distribución por sexos de los grupos control del estudio. A) Representación del porcentaje de sexos del grupo control para el estudio de genotipado. B) representación del porcentaje de sexos del grupo control para el estudio de inmunoterapia.

Grupos de pacientes para estudio de inmunoterapia

Se incluyeron 50 pacientes con diagnóstico clínico de rinoconjuntivitis y /o asma alérgicas, de carácter estacional debidas a hipersensibilidad al polen de *Phleum pratense*, de los cuales 24 recibieron la dosis baja del tratamiento, 1.000 DPP/ml (G1) y 26 la dosis alta del tratamiento, 10.000 DPP/ml (G2). En relación al porcentaje de pacientes con asma se evidenció un 37,5% en el G1 y 42,3% el G2. Las características demográficas de estos dos grupos se incluyen en la tabla 10.

Tabla 10. Características demográficas de los grupos que recibieron tratamiento.

Características	G1	G2
Edad (años)	Media 26,58 ± 6,85	Media 24,85 ± 6,29
Sexo	Masculino 45,80 %	Masculino 53,8 %
	Femenino 54,20 %	Femenino 46,2 %
IgE total (KU/L) ± D.E.	Media 282,16 ± 382,79	Media 277,75 ± 318,52

Las sensibilizaciones a los distintos aeroalérgenos de los pacientes se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Porcentaje de sensibilizaciones a los distintos aeroalérgenos en cada grupo que recibió tratamiento.

AEROALÉRGENO	G1 (n y %)	G2 (n y %)	GP (n y %)
ÁCAROS	2 (8,7)	3 (13,04)	2 (8,7)
HONGOS	0 (0,00)	0 (0,00)	1(4,4)
EPITELIOS	3 (13)	5 (21,7)	4 (17,4)
EPITELIOS Y ÁCAROS	3 (13)	0 (0,00)	0 (0,00)

En relación a los porcentajes de pacientes monosensibilizados (pacientes en quienes las pruebas cutáneas dieron positivas solo a un grupo de alérgenos, en este caso al polen) en el G1 fue del 66,70%, en el G2 del 69,20%, y en el GP del 70,80%.

Grupos de pacientes para estudio de genotipado

Se incluyeron 172 pacientes con diagnóstico clínico de rinoconjuntivitis y /o asma alérgicas. Las características demográficas de este grupo se incluyen en la tabla 12.

Tabla 12. Características demográficas de los pacientes pertenecientes al estudio de genotipado

Características	Datos
Edad (años)	Mediana 25 (RI:37)
Sexo	Masculino 43,9 %
	Femenino 56,1 %
IgE total (KU/L) \pm D.E.	Media 384,3 \pm 680,6

La sensibilización fue a diferentes aeroalérgenos: hongos, ácaros, polen, epitelios o polisensibilizados. La distribución de la sensibilización en los pacientes se presenta en la tabla 13.

5.2 Análisis descriptivo clínico del estudio de inmunoterapia

En total se aleatorizaron 80 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y no presentaban ninguno de los criterios de exclusión. La población por intención de tratar (ITT) comprendió todos los pacientes adecuadamente aleatorizados que recibieron como mínimo una dosis de la medicación usada en el estudio, lo que supone 77 pacientes de los 80 aleatorizados en la población de seguridad (los 3 restantes no llegaron a tomar el tratamiento del estudio).

Tabla 13. Porcentaje de sensibilizaciones a los distintos aeroalérgenos en los pacientes pertenecientes al estudio de genotipado

AEROALÉRGENO	%
ÁCAROS	48,8
HONGOS	8,7
EPITELIOS	23,3
POLENES	62,2
POLISENSIBILIZADOS	43

5.2.1 Estudio de eficacia (población de análisis).

La eficacia fue evaluada en la población ITT, en la que se determinaron las siguientes variables: demográficas, Escala Visual Analógica (EVA), RQLQ (*Rhinoconjunctivitis Quality of life Questionnaire*, Cuestionario de Calidad de Vida en la Rinoconjuntivitis), determinaciones inmunoserológicas y pruebas de provocación nasal, además de la puntuación de síntomas y el consumo de medicación. Para la valoración de la eficacia, en la presente tesis, se empleó, además, la escala de la Puntuación Media de los Síntomas Ajustada (AdSS¹⁸⁸), en 73 individuos, toda vez que al rescatar la información para realizar dicho ajuste solo se dispuso de los datos relativos a ese número.

¹⁸⁸Grouin J.-M, Vicaut E, Jean-Alphonse S, Demoly P, Wahn U, Didier A, de Beaumont O, Montagut A, Le Gall M, Devillier P. The average Adjusted Symptom Score, a new primary efficacy end point for specific allergen immunotherapy trials. *Clinical Et Experimental Allergy*. 2011;41:1282-1288

El número de individuos (pacientes) por ITT quedó distribuido de la siguiente manera: G1, con 26 , G2, con 26, y GP, con 25, si bien para llevar a cabo la aplicación del AdSS, los grupos quedaron así: G1, 24 pacientes; G2, 26 pacientes; y GP, 23 pacientes, ya que al recuperar la información para la valoración de la eficacia con la escala de puntuación AdSS, solo se pudo contar con los datos de 73 pacientes, al no disponer de las cuatro historias restantes.

5.2.2 Características demográficas y exploración física

A nivel demográfico, los grupos de tratamiento fueron, en general, homogéneos, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Sus características se observan en la siguiente tabla 14.

Tabla 14. Características demográficas y hallazgos en la exploración física.

	G1	G2	GP
Sexo (%varones)	46,1 %	50 %	32 %
Edad en años	25,8 ± 6,8	24,8 ± 6,4	26,3 ± 8,1
Altura en cm	171,3 ± 10,0	171,7 ± 9,4	167,2 ± 8,3
Peso en kilos	72,2 ± 15,0	70,2± 16,7	70,1 ± 12,2
IMC	24,4 ± 3,6	23,6 ±3,9	25,1 ± 4,0

En la exploración física se encontraron 3 situaciones peculiares: alopecia areata occipital en un paciente del G1; amputación de dedos en la mano derecha en un paciente del G2 y mucosidad faríngea en un paciente del GP.

En relación a los antecedentes patológicos se observó, en el G1, un antecedente de aborto inducido; y entre todos los grupos, 16 alteraciones en el sistema otorrinolaringológico distribuidas de la siguiente manera: 5 en el G1 (3 que

persistían, congestión nasal, tos productiva, rinitis, faringitis y proceso catarral); 8 en el G2 (4 que persistían, fiebre, rinorrea, tos seca, odinofagia, dos casos de congestión nasal, rinorrea acuosa y otitis); y, por último, 3 casos en el GP (uno que persistía, dos casos de faringoamigdalitis y congestión nasal). Hay que anotar que en un mismo sujeto podía presentar más de un antecedente patológico en un mismo sistema o en otro.

5.3 Resultados de eficacia clínica

5.3.1 Variable principal de eficacia: suma de las puntuaciones de síntomas y de medicación en la época polínica.

La principal variable de eficacia en este ensayo consistió en la media de la suma de las puntuaciones de síntomas y medicación a lo largo de la época polínica. Los datos empleados correspondieron a los pacientes con ITT (77). Dos pacientes no suministraron la hoja de síntomas, uno en el G1 y otro en el GP.

El grupo que presentó la media de puntuación tras el tratamiento más baja ($5,0 \pm 4,3$) fue el G2; el G1 presentó una puntuación intermedia ($6,4 \pm 7,2$) y, por último, GP presentó la media más alta ($6,8 \pm 4,9$), véase la tabla 6. Sin embargo, al realizar la comparación entre los grupos no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, tanto a nivel global ($p=0,49$) como comparando entre G1 y G2 ($p=0,37$); G1 y GP ($p=0,82$); y G2 y GP ($p=0,27$).

A continuación se detallan los datos relacionados con la variable en relación con cada grupo objeto de estudio (tabla 15).

5.3.2 Eficacia mediante el empleo de la puntuación media de los síntomas ajustada (AdSS)

Como se ha comentado previamente, para la valoración de la eficacia con la escala de puntuación AdSS, solo se pudo contar con los datos de 73 pacientes. El grupo que presentó la AdSS con la puntuación más baja ($4,66 \pm 3,70$) fue el G2; el G1 presentó una puntuación intermedia ($4,96 \pm 5,17$); y, por último, el GP presentó la puntuación AdSS más elevada ($5,89 \pm 4,67$).

Tabla 15. Suma (media) de los resultados de síntomas y de medicación presentados durante la época de polinización

Estadístico	GP	G1	G2
N	24	25	26
Media \pm D.E.	6,8 (4,9)	6,4 (7,2)	5,0 (4,3)
IC95%Media	(4,7, 8,9)	(3,4, 9,4)	(3,2, 6,8)
Mediana	5,7	4,2	4,3
Q1/Q3	(2,4, 10,4)	(1,4, 6,3)	(1,5, 7,2)
Min/Max	(1, 17,8)	(0, 26,6)	(0, 15,8)

Nuevamente, cuando se realizó la comparación entre grupos no se observaron diferencias estadísticamente significativas, tanto a nivel global ($p=0,62$) como al

comparar entre los tratamientos (G1 y G2, $p=0,81$; G1 y GP, $p=0,52$; G2 y GP, $p=0,31$).

A continuación (tabla 16) se detallan los datos relacionados con la variable en relación con cada grupo objeto de estudio en la época polínica.

Tabla 16. Suma (media AdSS) de los resultados de síntomas y de medicación presentados en el ciclo polínico para la población AdSS

Estadístico	GP	G1	G2
N	23	24	26
Media \pm D.E.	5,89 \pm 4,67	4,96 \pm 5,17	4,66 \pm 3,70
IC95%media	(3,9, 7,9)	(2,8, 7,1)	(3,2, 6,2)
Mediana	5,4	3,4	4,5
Min/Max	(0,4, 18,0)	(0, 18,0)	(0,1, 11,9)

En resumen, el análisis de la puntuación de síntomas no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento y el placebo, si bien se observó una disminución de la puntuación en los grupos que recibieron tratamiento activo, que ya se apreciaba en el G1 y que fue mayor en el G2; esto sucedió para todos los sistemas de evaluación estudiados (ver tabla 17). Lo mismo ocurrió en el caso del consumo de medicación, los pacientes que recibieron inmunoterapia requirieron menos medicación de rescate (y el G2 requirió menos que el G1) que el grupo placebo, si bien estas diferencias tampoco resultaron estadísticamente significativas.

Cuando se llevó a cabo el análisis estadístico de muestras relacionadas a nivel global, donde se comparó el método ARTSS frente al AdSS, se observaron

diferencias estadísticamente significativas ($p = <0,0001$), siendo la media de ARTSS de $3,88 (\pm 3,47)$ y la media de AdSS de $5,15 (\pm 4,50)$.

Tabla 17. Medias en los diferentes sistemas de evaluación realizados con la escala de la puntuación media de los síntomas ajustada entre los diferentes grupos del estudio.

AdSS	GP media±D.E.	G1 media±D.E.	G2 media±D.E.	G1+G2 media±D.E.
ARTSS (media del puntaje total de los síntomas de rinoconjuntivitis)	4,36 ± 3,34	3,87 ± 4,35	3,47 ± 2,64	3,66 ± 3,53
ARMS (media del puntaje de la medicación de rescate)	0,86 ± 0,69	0,71 ± 0,56	0,63 ± 0,59	0,67 ± 0,58
ACS (media del puntaje combinado)	0,79 ± 0,57	0,64 ± 0,55	0,60 ± 0,47	0,62 ± 0,50
AdSS (media del puntaje de síntomas ajustada)	5,89 ± 4,67	4,96 ± 5,17	4,66 ± 3,70	4,81 ± 4,42

5.3.3 Cuestionario para la calidad de vida para la rinitis (RQLQ)

La recogida de datos para este cuestionario se llevó a cabo en dos visitas: la basal, realizada entre el 11 de octubre y el 29 de febrero de 2008 y entre el 12 de septiembre de 2008 y el 3 de marzo de 2009; y la visita 3, realizada entre el 1 de julio y el 22 de octubre de 2008 y entre el 26 de junio y el 24 de julio de 2009.

El cuestionario RQLQ buscó comparar la diferencia de las puntuaciones (medias) entre la última visita (visita 3) y la visita basal entre los pacientes que recibieron placebo y los que recibieron las distintas dosis de tratamiento.

Los puntajes fueron obtenidos de la media de todos los ítems en cada paciente, en donde la puntuación 0 correspondió a la ausencia de molestia y la puntuación 6 la máxima molestia (cada ítem tomó un valor de 0 a 6). Un individuo del G1 y otro del GP no realizaron la puntuación del cuestionario en la visita final.

A nivel global, la media para el G1 fue de $1,13 \pm 1,58$; para el G2: $0,63 \pm 1,41$ y para el grupo GP: $0,65 \pm 0,93$ (siendo parecidas estas dos últimas ver tabla 18).

Tabla 18. Diferencia del puntaje global entre la visita 3 y la visita basal en el cuestionario RQLQ

	Estadístico	G1	G2	GP
Puntuación Global	N	25	26	24
	Media \pm D.E.	$1,13 \pm 1,58$	$0,63 \pm 1,41$	$0,65 \pm 0,93$
	95% IC Media	(0,48, 1,79)	(0,06, 1,20)	(0,25, 1,04)
	Mediana	1,39	0,73	0,46
	Q1/Q3	(0,11, 2,04)	(-0,18, 1,82)	(0,05, 1,21)
	Min/Max	(-2,1, 4,32)	(-2,4, 2,68)	(-1,4, 2,71)

En los tres grupos, a nivel global, la diferencia media entre la visita 3 y la visita basal fue positiva, indicando que la puntuación media aumentó. Los puntajes se observan en las tablas 19, 20 y 21, hacen referencia a la diferencia de las

puntuaciones globales obtenidas entre la visita 3 y la basal. Las diferencias entre los puntajes en el cuestionario RQLQ no resultaron estadísticamente significativas entre los tres grupos de tratamiento, ni a nivel global ($p=0,33$).

Tabla 19. Comparación de las puntuaciones entre la visita 3 y la visita basal en el cuestionario RQLQ en el G1.

	Estadístico	Basal	Final	Diferencia
Puntuación Global	N	26	25	25
	Media \pm D.E.	1,00 \pm 1,10	2,14 \pm 1,46	1,13 \pm 1,58
	95% IC Media	(0,56, 1,44)	(1,54, 2,75)	(0,48, 1,79)
	Mediana	0,73	2,21	1,39
	Q1/Q3	(0,00, 1,72)	(1,11, 3,43)	(0,11, 2,04)
	Min/Max	(0,0, 3,79)	(0,0, 4,68)	(-2,1, 4,32)

5.3.4 Escala visual analógica (EVA)

Se analizaron a la par la EVA del paciente y la del investigador, mediante un modelo lineal general de medidas repetidas para cada grupo de tratamiento.

Los valores de la EVA se compararon entre las visitas 0, 2 y 3. La visita 0 tuvo lugar entre los días 11 de octubre y 29 de febrero de 2008 y entre el 12 de septiembre de 2008 y el 3 de marzo de 2009. La visita 2 aconteció entre el 5 y el 28 de mayo de 2008 y a partir del 5 de mayo hasta el 22 del mismo mes del 2009. La visita 3 se realizó entre el 1 de julio y el 22 de octubre del 2008 y entre el 26 de junio y el 24 de julio 2009.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos a lo largo de las visitas (valor $p < 0,0001$). Hubo diferencias entre la visita 0 y las dos visitas (2 y 3), pero no se observaron diferencias estadísticamente

significativas entre las visitas 2 y 3 ($p>0,05$ en los tres grupos). Se observaron las mismas tendencias en la EVA de los pacientes y en la EVA de los investigadores. Un paciente de la población con la ITT no tuvo valoraciones en la visita 3. Las medidas obtenidas en cada visita se muestran en las tablas a continuación (Ver tablas 22 y 23).

Tabla 20. Comparación de las puntuaciones entre la visita 3 y la visita basal en el cuestionario RQLQ en el G2.

	Estadístico	Basal	Final	Diferencia
Puntuación Global	N	26	26	26
	Media \pm D.E.	1,02 \pm 1,00	1,65 \pm 1,27	0,63 \pm 1,41
	95% IC Media	(0,61, 1,42)	(1,14, 2,16)	(0,06, 1,20)
	Mediana	0,75	1,43	0,73
	Q1/Q3	(0,18, 1,79)	(0,43, 2,68)	(-0,18, 1,82)
	Min/Max	(0,0, 3,86)	(0,0, 4,21)	(-2,4, 2,68)

No se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos respecto a esta variable, ni en la EVA de los pacientes ni en la del investigador para cada visita por separado. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de tratamiento, sin embargo los orientan hacia el bienestar de los pacientes a lo largo del tiempo (entre la época prepolínica y la polínica).

Tabla 21. Comparación de las puntuaciones entre la visita 3 y la visita basal en el cuestionario RQLQ en el GP.

	Estadístico	Basal	Final	Diferencia
Puntuación Global	N	25	24	24
	Media(D.E.)	0,94 \pm 1,00	1,59 \pm 1,11	0,65 \pm 0,93
	95% IC Media	(0,53, 1,36)	(1,12, 2,06)	(0,25, 1,04)
	Mediana	0,54	1,39	0,46
	Q1/Q3	(0,14, 1,75)	(0,50, 2,46)	(0,5, 1,21)
	Min/Max	(0,0, 3,18)	(0,0, 3,54)	(-1,4, 2,71)

Tabla 22. Puntuación de medias obtenidas en la EVA en las 3 visitas en la evaluación realizada por el paciente.

Visita	Estadístico	GP	G1	G2	Total
0	N	25	26	26	77
	Media \pm D.E.	2,6 \pm 2,0	3,1 \pm 1,8	3,8 \pm 2,2	3,2 \pm 2,0
	95% IC Media	(1,8, 3,4)	(2,4, 3,8)	(2,9, 4,7)	(2,7, 3,6)
	Mediana	2,4	2,9	2,9	(2,7)
	Q1/Q3	(1,5, 3,3)	(2,0, 3,9)	(2,2, 5,1)	(2,0, 4,3)
	Min/Max	(0,0, 10,0)	(0,4, 7,1)	(0,2, 7,9)	(0,0, 10,0)
2	N	25	26	26	77
	Media \pm D.E.	6,3 \pm 1,7	6,9 \pm 2,1	6,9 \pm 2,0	6,7 \pm 2,0
	95% IC Media	(5,6, 7,1)	(6,1, 7,8)	(6,1, 7,7)	(6,3, 7,2)
	Mediana	6,5	7,6	6,8	6,7
	Q1/Q3	(5,2, 7,6)	(4,9, 8,7)	(5,9, 8,6)	(5,4, 8,4)
	Min/Max	(2,2, 9,1)	(3,0, 9,8)	(2,2, 10,0)	(2,2, 10,0)
3	N	25	25	26	76
	Media \pm D.E.	7,0 \pm 2,2	6,3 \pm 3,0	6,9 \pm 2,4	6,7 \pm 2,5
	95% IC Media	(6,1, 7,9)	(5,1, 7,6)	(5,9, 7,9)	(6,2, 7,3)
	Mediana	7,7	6,7	7,3	7,5
	Q1/Q3	(6,6, 8,5)	(3,5, 9,2)	(4,5, 9,2)	(4,5, 8,8)
	Min/Max	(2,1, 9,3)	(1,2, 10,0)	(2,3, 10,0)	(1,2, 10,0)

5.3.5 PRUEBA DE PROVOCACIÓN NASAL

En esta prueba se evaluaron los porcentajes de pacientes que dieron positivo en cada concentración y grupo de tratamiento.

La VB se efectuó entre el 11 de octubre y el 29 de febrero de 2008 y entre el 12 de septiembre de 2008 y el 3 de marzo de 2009, en tanto la V4 tuvo lugar entre el 29 de agosto y el 20 de noviembre de 2008 y entre el 26 de agosto y el 24 de septiembre de 2009.

En la VB, para la concentración más baja, (0,03 HEP/ml), resultaron positivos un sujeto del G1, 3 del G2 y 4 del GP (ver tabla 24). La mayoría de los sujetos de cada grupo dieron positivo a la concentración 0,3 HEP/ml en la VB.

Tabla 23. Puntaje de medias obtenidas en la EVA en las 3 visitas en la evaluación realizada por el investigador.

Visita	Estadístico	GP	G1	G2	Total
0	N	25	26	26	77
	Media ± D.E.	4,0 ± 1,9	4,0 ± 1,7	4,1 ± 1,8	4,0 ± 1,8
	95% IC Media	(3,2, 4,8)	(3,3, 4,7)	(3,4, 4,9)	(3,6, 4,4)
	Mediana	3,2	3,4	3,5	3,3
	Q1/Q3	(2,5, 5,6)	(2,8, 5,1)	(2,7, 6,1)	(2,7, 5,6)
	Min/Max	(1,9,8,6)	(2,0, 7,3)	(1,8, 7,3)	(1,8, 8,6)
2	N	25	26	26	77
	Media ± D.E.	6,8 ± 0,7	7,0 ± 1,0	7,0 ± 1,1	6,9 ± 0,9
	95% IC Media	(6,6, 7,1)	(6,6, 7,3)	(6,6, 7,4)	(6,7, 7,1)
	Mediana	6,7	7,0	7,3	7,1
	Q1/Q3	(6,2, 7,2)	(6,1, 7,8)	(6,2, 7,8)	(6,2, 7,7)
	Min/Max	(5,7, 8,4)	(5,5, 9,1)	(4,4, 8,6)	(4,4, 9,1)
3	N	25	25	26	76
	Media ± D.E.	7,2 ± 1,0	6,9 ± 1,5	7,4 ± 1,0	7,1 ± 1,2
	95% IC Media	(6,7, 7,6)	(6,2, 7,5)	(7,0, 7,8)	(6,9, 7,4)
	Mediana	7,2	7,7	7,4	7,4
	Q1/Q3	(6,6, 7,7)	(5,6, 8,1)	(6,6, 8,3)	(6,3, 8,1)
	Min/Max	(4,9, 9,0)	(4,3, 9,3)	(5,0, 8,9)	(4,3, 9,3)

Los grupos G1 y G2 dieron positivo un 26,9 y 30,8% respectivamente en la visita basal a la concentración 3 HEP/ml, en tanto que en el GP el 76 % de los sujetos dieron positivo a las concentraciones 0,3 HEP/ml. En la V4 el porcentaje de pacientes que dieron positivo a la concentración de 3 HEP/ml aumentó en los 3 grupos (ver tabla 24).

Los grupos G1 y G2 dieron positivo en un 26,9 y 30,8%, respectivamente, en la visita basal a la concentración 3 HEP/ml, en tanto que en el GP, el 76 % de los

sujetos dieron positivo a las concentraciones 0,3 HEP/ml. En la V4 el porcentaje de pacientes que dieron positivo a la concentración de 3 HEP/ml aumentó en los 3 grupos (ver tabla 24).

Tabla 24. Provocación nasal en la visita basal (VB) y visita 4 (V4). Número y porcentajes de pruebas positivas a distintas concentraciones de HEP/ml: 30 HEP/m, 3 HEP/ml, 0,3 HEP/ml y 0,03 HEP/ml

Visita	Concentración (HEP/ml)	Estadístico	GP n=25	G1 n=26	G2 n=26
Basal	30		0 (0,0%)	3 (11,5%)	1 (3,9%)
	3		2 (8,0%)	7 (26,9%)	8 (30,8%)
	0,3		19 (76,0%)	15 (57,7%)	14 (53,9%)
	0,03		4 (16,0%)	1 (3,9%)	3 (11,5%)
Visita 4	30		4 (17,4%)	2 (8,7%)	4 (15,4%)
	3		9 (39,1%)	10 (43,5%)	11 (42,3%)
	0,3		9 (39,1%)	10 (43,5%)	7 (26,9%)
	0,03		1 (4,4%)	1 (4,4%)	4 (15,4%)

Al realizar la comparación, entre los grupos de tratamiento de los pacientes que precisaron una concentración superior, igual o inferior para presentar una respuesta positiva en la visita final, se encontró que, de los 72 individuos de la población ITT que realizaron la prueba de provocación nasal en las dos visitas (5 pacientes no se realizaron la prueba de provocación nasal en la visita 4), 31 dieron positivo a una concentración más alta, 12 a una concentración más baja y 29 no presentaron cambio. Sin embargo no se observó asociación con el grupo de tratamiento ($p=0,0851$), si bien estuvo cercana a la significación. Para el G1, se observó un mayor número de individuos que necesitaron una concentración menor para dar positivo ($n=7$), ver tabla 25.

Para describir adecuadamente el cambio de concentración entre las V4 y VB se etiquetaron las concentraciones 0,03, 0,3, 3 y 30 HEP/ ml como 1, 2, 3 y 4. Estas etiquetas permiten ver que entre una concentración y la siguiente el cambio es igual de tamaño y al restarse la magnitud es la misma. Por ejemplo, para un sujeto con valor de concentración 0,03 (etiquetado como 1) en la VB y 0,3 (etiquetado como 2) en la visita V4, el cambio sería de una unidad, que representaría una multiplicación de la concentración por 10^1 . Si en la V4 en el mismo caso la concentración fuera 3 (etiquetado como 3), el cambio sería de 2 unidades y representarían una multiplicación de la concentración por 10^2 .

Tabla 25. Comparación entre grupos de la proporción de sujetos que necesitaron una concentración más alta, igual o más baja para dar una respuesta positiva en la prueba de provocación nasal (población ITT)

	G 1 n=26	G2 n=26	GP n=25	Total
Concentración más alta	8 (11,1%)	9 (12,5%)	14 (19,4%)	31 (43,1%)
Misma concentración	8 (11,1%)	13 (13,8%)	8 (11,1%)	29 (40,3%)
Concentración más baja	7 (9,7%)	4 (5,6%)	1 (1,4%)	12 (16,7%)
Total	23(31,9%)	26 (36,1%)	23 (31,9%)	72 (100,0%)

Las diferencias de las concentraciones de extracto que causaron una respuesta positiva entre la V4 y la VB fueron estadísticamente significativas ($p=0,0226$) (ver tabla 26).

Para cada grupo de tratamiento se evaluó el cambio en la concentración del extracto de *Phleum* que producía una prueba de provocación nasal positiva entre

el valor final y el valor basal (comparaciones intragrupo). Se observó una significación estadística en el cambio de concentración entre las dos visitas en el grupo GP ($p=0,0002$) (ver tabla 27).

Tabla 26. Diferencia de la concentración del extracto de *Phleum* que causó una prueba de provocación nasal positiva entre el valor final (V4) y el valor basal (VB). Comparación entre tratamientos (población ITT).

	GP	G1	G2	Valor de p
Estadístico				
N	23	23	26	
Media \pm D.E.	0,74 \pm 0,81	0,04 \pm 0,82	0,31 \pm 0,88	
95% IC Media	(0,39, 1,09)	(-0,31, 0,40)	(-0,05, 0,66)	
Mediana	1,00	0,00	0,00	
Q1/Q3	(0,00, 1,00)	(-1,00, 1,00)	(0,00, 1,00)	
Min/Max	(-1,0, 2,00)	(-1,0, 1,00)	(-1,0, 2,00)	
valor de p				0,0226

Los resultados previos muestran que, a lo largo del tratamiento, se produjeron cambios en la respuesta nasal al extracto en los diferentes grupos evaluados, observándose diferencias estadísticamente significativas en el cambio en la concentración del extracto de *Phleum* que producía una prueba de provocación nasal positiva entre el valor final y el valor basal en el grupo placebo; para los otros dos grupos no se observaron diferencias.

Tabla 27. Diferencia de la concentración del extracto de Phleum que causó una prueba de provocación nasal positiva entre el valor final y el valor basal. Comparación intragrupo.

Estadístico	G1			G2			GP		
	Basal	Final	p-valor	Basal	Final	p-valor	Basal	Final	p-valor
N	26	23		26	26		25	23	
Media ± D.E.	2,46±0,76	2,57±0,73		2,27±0,72	2,58±0,95		1,92±0,49	2,70±0,82	
95% IC Media	(2,15, 2,77)	(2,25, 2,88)		(1,98, 2,56)	(2,20, 2,96)		(1,72, 2,12)	(2,34, 3,05)	
Mediana	2,00	3,00		2,00	3,00		2,00	3,00	
Q1/Q3	(2,00, 3,00)	(2,00, 3,00)		(2,00, 3,00)	(2,00, 3,00)		(2,00, 3,00)	(2,00, 3,00)	
Min/Max	(1,0, 4,00)	(1,0, 4,00)	0,8027	(1,0, 4,00)	(1,0, 4,00)	0,0881	(1,0, 3,00)	(1,0, 4,00)	0,0002

5.4 Resultados de eficacia inmunoserológicos

5.4.1 Parámetros inmunoserológicos (inmunoglobulinas)

Por cada tratamiento se compararon los niveles de los diferentes parámetros inmunoserológicos entre la visita basal (VB) y visita final (V4) (comparación intragrupo). En el anexo 1 se indica el número de datos disponibles; es necesario aclarar que hubo algunos datos perdidos en algunas de las variables inmunoserológicas. En la misma tabla se presentan los datos de los 4 parámetros inmunoserológicos que se recogieron en ambas visitas por tratamiento (ver anexo 1).

Al determinar los niveles de inmunoglobulinas en los tres grupos, G1, G2 y GP, no se observaron diferencias estadísticamente significativas a nivel basal.

Igualmente ocurrió al analizarlos a nivel global, tampoco se presentaron diferencias significativas.

Al realizar la comparación entre grupos de tratamiento respecto al grupo placebo entre visita basal y final no se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros inmunoserológicos evaluados.

Grupo placebo (GP)

No se observaron diferencias antes y después de la IT para el grupo placebo

Grupo 1 (G1) (dosis baja)

El estudio de los niveles de las distintas inmunoglobulinas en los pacientes no mostró, en líneas generales, diferencias significativas entre el grupo placebo y el grupo tratado, si bien los valores de las inmunoglobulinas resultaron más elevados para las inmunoglobulinas en la visita 4 respecto a la basal en los pacientes que recibieron ITSL. No obstante, se observaron diferencias significativas al comparar la IgE específica frente al *Phleum* (visita basal $79,46 \pm 121,46$ vs. visita 4: $136,32 \pm 242,09$; $p=0,028$) y la IgG4 frente al *Phleum* (visita basal: $0,29 \pm 0,23$ vs. Visita 4: $0,34 \pm 0,27$; $p=0,033$ que fueron más elevadas en los pacientes tratados a dosis bajas, después de la IT (ver anexo1).

Grupo 2 (G2) (dosis alta)

A dosis altas no se observaron diferencias tras el tratamiento (ver anexo 1).

Grupo 1 y grupo 2 (dosis baja y dosis alta)

Al comparar los niveles de inmunoglobulinas de los grupos tratados (G1 y G2) frente al GP no se evidenciaron diferencias significativas (no se muestran los datos).

Sin embargo al evaluar los niveles de la IgE total, IgE *Phleum*, IgG *Phleum* e IgG4 *Phleum* se observó una tendencia a aumentar en la visita final, aunque no de manera significativa, y quienes no aumentaron conservaron unos valores muy similares a los de la visita basal, como es el caso de la IgE *Phleum* (G2: 67,3 media pre - 66,3 media post; GP: 74,3 - 69,4 media post), IgG *Phleum* (G2: 7,74 media pre - 5,33 media post) e IgG4 *Phleum* (GP: 0,43 media pre - 0,32 media post) (ver anexo 1).

Se determinaron los niveles de IgE total, IgE específica frente a *Phleum*, IgG específica frente a *Phleum* e IgG4 específica frente a *Phleum* antes de la inmunoterapia y después de la misma en todos los pacientes tratados (agrupando G1 y G2), observándose una diferencia significativa entre la visita basal y tras la IT para la IgE específica frente a *Phleum*: $72,75 \pm 106,11$ vs $97,56 \pm 178,01$ ($p=0.006$) (ver tabla 28).

5.4.2 Análisis de inmunoglobulinas correlaciones

Análisis de inmunoglobulinas a nivel basal

Previamente al tratamiento se encontró una correlación directa entre la IgE total y la IgE *Phleum*, con una $r = 0.808^{**}$ ($p < 0,0001$).

Tabla 28. Media de los niveles pre y postratamiento de Inmunoglobulinas en todos los pacientes que recibieron inmunoterapia (G1 y G2)

	Media \pm D.E. pre-inmunoterapia	Media \pm D.E. post-inmunoterapia	Valor p
IgE total	279,72 \pm 344,75	341,91 \pm 468,83	0,061
IgE <i>Phleum</i>	72,75 \pm 106,11	97,56 \pm 178,01	0,006
IgG <i>Phleum</i>	7,03 \pm 10,02	11,12 \pm 40,35	0,244
IgG4 <i>Phleum</i>	0,32 \pm 0,35	0,33 \pm 0,40	0,198

Análisis de inmunoglobulinas postratamiento

El nivel de correlación entre la *IgG4* en forma aislada y la *IgE Phleum* fue de $R: 0,695^{**}$, con una $p=0,001$, en el caso de la dosis más baja, y entre la IgE y la *IgE Phleum*: $R: 0,583^{**}$, con una $p=0,005$ en el caso de la dosis más baja.

En los pacientes que recibieron la dosis más elevada de inmunoterapia mejoraron los niveles de correlación de la *IgE Phleum* con la IgE ($0,794^{**}$, $p < 0,0001$), de la *IgG Phleum* con la *IgE Phleum*, $p < 0,0001$ con una correlación de 0.721^{**} . En todos los casos la correlación fue directa.

En los pacientes que recibieron la menor dosis de inmunoterapia se observó una correlación de la *IgG Phleum* con todas las citocinas estudiadas, siendo en todos los casos una correlación directa.

5.5 Niveles de citocinas

Se realizaron comparaciones de los niveles de citocinas entre los diferentes grupos y a nivel intragrupal entre la visita basal (VB) y visita final (V4).

Grupo 1 (G1) (dosis baja)

No se observaron diferencias significativas entre el grupo placebo y el grupo tratado con IT a dosis bajas para ninguna de las citocinas.

Grupo 2 (G2) (dosis alta)

Tras el tratamiento a dosis altas se observó que los pacientes presentaron niveles significativamente menores de GM-CSF en relación al grupo placebo ($6,86 \pm 12,65$ vs $15,63 \pm 35,19$, respectivamente; $p=0.032$), si bien el poder estadístico fue bajo (20,5).

Grupo 1 y grupo 2 agrupados respecto al grupo placebo

Para obtener mayor potencia estadística, se agruparon ambos grupos de tratamiento respecto al placebo. Se observó una diferencia estadísticamente

significativa al realizar la comparación de los niveles de citocinas entre el GP y los grupos que recibieron IT (G1 y G2), estos últimos presentaron niveles significativamente menores de GM-CSF después del tratamiento en comparación al grupo placebo ($7,35 \pm 12,33$ vs $15,63 \pm 35,19$, $p=0,029$). En este caso poder estadístico también fue bajo (19,5).

Además, tras el tratamiento a nivel global los niveles de IL-10 fueron significativamente menores ($2,65 \pm 3,16$ vs $1,61 \pm 2,07$ $p=0,001$), al igual que los de GM-CSF ($14,65 \pm 25,41$ vs $10,07 \pm 22,62$ $p=0,042$; poder estadístico 20,3%) y los de IL-2 ($14,27 \pm 26,96$ vs $9,46 \pm 20,45$ $p=0,013$; poder estadístico 22,1%). El poder estadístico para las diferencia de los niveles de IL10 fue del 63,4% (ver tabla 31).

Grupo 1 y 2 agrupados, V4 respecto a VB

Para ambos tratamientos se observaron diferencias entre la visita basal y tras IT, siendo los niveles más bajos tras el tratamiento para las citocinas IL-10 ($2,42 \pm 2,54$ vs $1,58 \pm 2,26$ $p=0,003$), cuyo poder estadístico fue del 39,5%, e IL-2 ($11,46 \pm 24,55$ vs $7,96 \pm 18,78$ $p=0,034$; poder estadístico 12,1%).

Estas diferencias no se observaron en el grupo placebo

5.6 Efecto de la inmunoterapia en los pacientes monosensibilizados o polisensibilizados: comparación pre y postratamiento

Los pacientes monosensibilizados presentaron unos niveles de IL-10 más elevados al inicio del estudio que los pacientes polisensibilizados. No se observaron diferencias para el resto de citocinas. Para este dato, se agruparon todos los pacientes en situación basal (ver tabla 29).

El análisis del efecto de la inmunoterapia en los pacientes monosensibilizados mostró diferencias entre la situación basal y tras el tratamiento, en donde a nivel de citocinas solo fueron significativos los de la IL2 e IL10 (ver tabla 31, sólo se incluyen aquellas diferencias que no han sido identificadas en el grupo placebo). La distribución de la monosensibilización y polisensibilización por grupos fue: G1, 16 monosensibilizados y 8 polisensibilizados; G2, 18 monosensibilizados y 8 polisensibilizados; GP, 17 monosensibilizados y 7 polisensibilizados.

Tabla 29. Medias de citocinas en monosensibilizados y polisensibilizados pre y postratamiento*

	MEDIA ± D.E. PRE	MEDIA ± D.E. +POST	P	PODER
CITOCINAS				
IL2 Monosensibilizados	17,41±31,30	10,77±23,38	0,029*	22,1
IL2 Polisensibilizados	6,94±8,70	6,42±10,82	0,173	5,3
IL10 Monosensibilizados	3,15±3,51	1,63±1,74	<0,0001*	77,5
IL10 Polisensibilizados	1,48±1,70	1,56±2,72	0,242	5,1
IL 4 Monosensibilizados	1,05±2,49	0,48±1,13	0,12	30,9
IL 4 Polisensibilizados	0,28±0,81	0,37±0,78	0,735	5,5
IL 5 Monosensibilizados	1,19±3,52	0,23±0,59	0,07	46,9
IL 5 Polisensibilizados	0,66±0,87	1,83±1,52	0,692	86,5

*(pg/ml)

El análisis del efecto de la inmunoterapia en los pacientes monosensibilizados mostró también diferencias significativas entre la situación basal y tras tratamiento en los niveles de las inmunoglobulinas; (ver tabla 30, sólo se incluyen aquellas diferencias que no han sido identificadas en el grupo placebo).

Tabla 30. Asociación de Inmunoglobulinas pretratamiento y postratamiento en los pacientes monosensibilizados

	MEDIA ± D.E. PRE	MEDIA ± D.E. POST	P	PODER %
INMUNOGLOBULINAS				
IgE específica frente a <i>Phleum</i>	70,90±101,42	88,85±161,48	0,037	10,1

En el grupo de pacientes polisensibilizados no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa antes y después del tratamiento.

A modo de resumen, en la tabla 31 se muestran las variaciones significativas entre los valores de citocinas, inmunoglobulinas antes y después de la IT, una vez descartadas todas aquellas asociaciones que se identificaban también en el grupo placebo.

Tabla 31. Asociación de citocinas e inmunoglobulinas postratamiento en los pacientes monosensibilizados.

	MEDIA± D.E. PRE	MEDIA± D.E. POST	P	PODER %
CITOCINAS				
IL-2	14,27±26,96	9,46±20,45	0.013	22,1
IL -10	2,65±3,16	1,61±2,07	0.001	63,4
INMUNOGLOBULINAS				
IgE <i>PHLEUM</i>	72,75±106,11	97,56±178,01	0.006	13,0

En el grupo de pacientes polisensibilizados, no se observaron apenas diferencias significativas antes y después del tratamiento.

5.7 Estudio genético

5.7.1 Distribución en la población control

Los estudios de asociación génica se realizan comparando las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes génicas que se pretenden asociar con la enfermedad en el grupo de pacientes frente a un grupo control.

En ocasiones se emplean las frecuencias alélicas descritas para poblaciones generales que están incluidas en bases de datos derivadas de estudios multicéntricos. Estas bases clasifican las poblaciones según el origen étnico. Entre ellas destaca HapMap por ser una de las más completas que estaban disponibles en el inicio de este trabajo. Dentro de las poblaciones incluidas en HapMap destaca la población de referencia CEU, constituida por habitantes de Utah, en EEUU, cuyos antepasados provienen de Europa del Norte y Occidental.

A efectos descriptivos, inicialmente se comparó la distribución de las frecuencias alélicas de los genes que codifican citocinas en nuestra población control con la distribución en la población CEU. Los resultados de estas distribuciones se observan en la tabla 32. Destacan algunas diferencias en la distribución de las frecuencias alélicas de los SNP de genes que codifican citocinas especialmente en -889C>T de *IL1A*, -1098 T>G de *IL4*, c10 T>C de *TGFB1* y -308 G>A de *TNFA*

Tabla 32. Distribución de frecuencias alélicas en nuestra población y en la población CEU

GEN	SNP	CEU	CONTROLES
<i>IL1A</i>	-889 C>T	T: 0,308	T: 0
<i>IL1B</i>	-511 C>T	T: 0,345	T: 0,299
<i>IL1B</i>	3962 C>T	T: 0,223	T: 0,168
<i>IL1R1</i>	<i>pstI</i> A C>T	T: 0,264	T: 0,329
<i>IL1RN</i>	<i>MspI</i> pos 30,735 T>C	C: 0,258	C: 0,242
<i>IL2</i>	-330 T>G	G: 0,232	G: 0,319
<i>IL2</i>	166 G>T	T: 0,342	T: 0,285
<i>IL4</i>	-1098 T>G	G: 0,092	G: 0,682
<i>IL4</i>	-589 C>T	T: 0,164	T: 0,143
<i>IL4</i>	-33 C>T	T: 0,158	T: 0,145
<i>IL4R</i>	1092 A>G	G: 0,225	G: 0,234
<i>IL6</i>	-174 G>C	C: 0,533	C: 0,377
<i>IL6</i>	<i>nt565</i> G>A	A: 0,481	A: 0,366
<i>IL10</i>	-592 C>A	A: 0,202	A: 0,309
<i>IL10</i>	-819 C>T	T: 0,173	T: 0,327
<i>IL10</i>	-1082 A>G	G: 0,533	G: 0,330
<i>IL12B</i>	-1188 A>C	C: 0,225	C: 0,169
<i>IFNG</i>	874 A>T	T: 0,542	T: 0,353
<i>TGFB1</i>	<i>c10</i> T>C	C: 0	C: 0,412
<i>TGFB1</i> Pob <i>CAUC1</i> SNP	<i>c25</i> G>C	C: 0,113	C: 0,122
<i>TNFA</i>	-238 G>A	A: 0,074	A: 0,076
<i>TNFA</i>	-308 G>A	A: 0,217	A: 0,062

5.7.2 Estudio de asociación génica

En el estudio de expresión de citocinas habíamos identificado una disminución de los niveles de citocinas IL-2 e IL-10 tras la inmunoterapia en pacientes monosensibilizados.

Para analizar la posible contribución de polimorfismos de los genes que codifican estas citocinas a la asociación con la sensibilización clínica, se realizó un estudio de asociación génica entre los SNP de citocinas y las características de la sensibilización. Para ello se empleó nuestra población control y se comparó con la población de pacientes alérgicos no incluidos en el ensayo clínico. Se confirmaron las asociaciones que se observan en la tabla 33.

Se observó una asociación del alelo mutado de -330 *IL2* con la sensibilización a los epitelios, en concreto un descenso de la frecuencia alélica en los pacientes respecto a los controles (0,20 vs 0,32) $p=0,05$, OR: 0,53 %95 CI=[0,28~1,00]. También del alelo mutado de *IL2* 166 y la sensibilización a los pólenes $p=0,01$, OR: 0,62 %95 CI=[0,42~0,91] y la polisensibilización $p=0,05$, OR: 0,65 %95 CI=[0,42~0,99]. En concreto se observó un aumento de la frecuencia alélica en los pacientes sensibilizados a los pólenes (0,61) frente a los controles (0,29) que se confirmó con la frecuencia genotípica (0,08 en controles vs 0,19 en pacientes, $p=0,03$).

Los pacientes polisensibilizados también presentaron un aumento en la distribución de la frecuencia alélica del alelo mutado (0,62) frente a los controles (0,29). En relación con la frecuencia genotípica, se identificó también una asociación con la presencia de alergia a los epitelios, si bien en este caso se detecta un incremento del alelo mutado en los pacientes (0,23) frente a los controles (0,08), $p=0,03$.

En cuanto al estudio de diplotipos, solo se observó una asociación estadísticamente significativa para el diplotipo TTTT del gen *IL2* (-330/166) con la sensibilización a los pólenes o a los epitelios ($p=0,01$; $p=0,02$, respectivamente), pero no con la mono o la polisensibilización.

Tabla 33. Asociación de las frecuencias alélicas y genotípicas de los controles y pacientes con sensibilización alérgica mediante p de Fisher.

		Ácaros	Pólenes	Epitelios	Hongos	Polisensibilizados
IL2 -330	Alélica	0,73	0,07	0,05*	0,89	0,09
				49,8%**		
	Genotípica	0,30	0,4	0,12	0,89	0,15
IL2 166	Alélica	0,07	0,01*	0,06	0,35	0,05*
			68,7%**			50,5%**
	Genotípica	0,17	0,03*	0,03*	0,50	0,11
			72%**	70,20%**		
IL10 -1082	Alélica	0,04*	0,35	0,03*	0,97	0,17
		54%**		59%**		
	Genotípica	0,12	0,48	0,09	0,95	0,38

* p de Fisher. ***poder estadístico*

Finalmente, identificamos una asociación del SNP *IL10-1082* con la sensibilización a los ácaros $p=0,04$ y con la sensibilización a los epitelios $p=0,03$, OR: 0,66 %95 CI=[0,44~0,98]. Detectamos un incremento de la frecuencia alélica del alelo mutado con la presencia de alergia a ácaros (0,57) frente a los controles (0,33) y en el grupo de pacientes alérgicos a los epitelios (0,53) frente a los controles (0,33).

El análisis de haplotipos del gen *IL10* (posiciones 1082/-819/-592) mostró una asociación estadísticamente significativa con la sensibilidad alérgica, GTC/ATA $p=0,045$; OR 0,205 (0,15 - 0,27), si bien sólo se encontró en un paciente.

DISCUSIÓN

6 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha evaluado la eficacia de la ITSL con dos extractos despigmentados y estandarizados de *Phleum pratense* a dos concentraciones diferentes. La eficacia se evaluó en la población ITT mediante los siguientes instrumentos: suma de las puntuaciones diarias de síntomas y de medicación de rescate en la época polínica, Escala Visual Analógica (EVA), RQLQ, determinaciones inmunoserológicas y pruebas de provocación nasal. Para la valoración de la eficacia, en la presente tesis, se empleó también la escala de la Puntuación Media de los Síntomas Ajustada (AdSS)¹⁸⁹.

Además, se ha realizado un estudio sobre la evolución de los niveles en sangre periférica de 9 citocinas diferentes. En este sentido, se ha comprobado, en un grupo paralelo de pacientes alérgicos y controles, la posible relación de los niveles de citocinas con polimorfismos en los genes que las codifican.

6.1 Estudio de eficacia

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo placebo y cualquiera de los grupos activos para la variable principal de eficacia, es decir la media de la suma de los síntomas y consumo de medicación durante la época de polinización. No obstante, se observó una media superior en el GP,

¹⁸⁹ Grouin J.-M, Vicaut E, Jean-Alphonse S, Demoly P, Wahn U, Didier A, de Beaumont O, Montagut A, Le Gall M, Devillier P. The average Adjusted Symptom Score, a new primary efficacy end point for specific allergen immunotherapy trials. *Clinical Et Experimental Allergy*. 2011;41:1282-1288

valores intermedios en el G1 y más elevados en el G2. Ante este resultado, se realizó un análisis mediante AdSS, recientemente descrito, que podría ser más ajustado, nuevamente sin encontrar diferencias estadísticamente significativas. Aunque en el caso de la variable eficacia se hayan obtenido resultados no significativos, es importante hacer una publicación de los mismos, a fin de evitar el sesgo de publicación¹⁹⁰¹⁹¹, es decir, el hecho de publicar preferentemente los resultados positivos de un tratamiento, lo que influye particularmente en los metanálisis¹⁹².

Se ha demostrado la eficacia de la Inmunoterapia con alérgenos, tanto por vía sublingual como subcutánea. Dos metanálisis¹⁹³ muy recientes así lo confirman, tanto para la rinitis alérgica como para el asma, si bien los datos no parecen tan claros en el caso del asma para la ITSL. En nuestro estudio son varias las posibilidades que existen para explicar la falta de eficacia clínica. En primer lugar, puede tratarse de que, efectivamente, el tratamiento fuera ineficaz. Sin embargo, esto parece estar en contradicción con los metanálisis existentes¹⁹⁴, que

¹⁹⁰ Slavin R. best evidence synthesis: an intelligent alternative to meta-analysis. *J Clin Epidemiol* Vol. 48, No. 1, pp. 9-18, 1995

¹⁹¹ Natalie McGauran, Beate Wieseler, Julia Kreis, Yvonne-Beatrice Schüler, Heike Kölsch and Thomas Kaiser. Reporting bias in medical research - a narrative review. *McGauran et al. Trials* 2010, 11:37.

¹⁹² Dhami S, Kakourou A, Asamoah F, Agache I, Lau S, Marek J, Muraro A, Roberts G, Akdis CA, Bonini M, Cavkaytar O, Flood B, Gajdanowicz P, Izuhara K, Kalayci Ö, Mosges R, Palomares O, Pfaar O, Smolinska S, Sokolowska M, Asaria M, Netuveli G, Zaman H, Akhlaq A, Sheikh A. Allergen immunotherapy for allergic asthma: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2017 May 19.

¹⁹³ Dhami S, Nurmatov U, Arasi S, Khan T, Asaria M, Zaman H, y cols. Allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2017 May 11. Dhami S, Kakourou A, Asamoah F, Agache I, Lau S, Marek J, y cols. Allergen immunotherapy for allergic asthma: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2017 May 19.

¹⁹⁴ Dhami S, Nurmatov U, Arasi S, Khan T, Asaria M, Zaman H, y cols. A. Allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2017 May 11. Dhami S, Kakourou A, Asamoah F, Agache I, Lau S, Marek J, y cols.. Allergen immunotherapy for allergic asthma: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2017 May 19. Wilson DR, Lima MT, Durham SR. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2005 Jan;60(1):4-12..

demuestran la efectividad de la ITSL en la rinoconjuntivitis alérgica. A esto se une el hecho de que haya una graduación en los síntomas y consumo de medicación, más intensos en el GP, intermedios en el G1 y más bajos en el G2, lo que sugeriría un cierto efecto del tratamiento. Es más probable que la no significación sea debida a otros factores. En este sentido uno de ellos puede ser el escaso tiempo de duración de la ITSL, dos meses en este caso. Aunque se pueden observar efectos inmunológicos tan pronto como a las 4 semanas¹⁹⁵, es difícil que el efecto clínico sea manifiesto. Por otro lado, este corto plazo de administración de las dosis puede haber influido en la falta de eficacia clínica.

Para comparar con los estudios más documentados, es decir, los estudios de ITSL con comprimidos, en los estudios más cortos, la duración media del tratamiento fue de 18 semanas¹⁹⁶, o se administró al menos 16 semanas antes de la estación y durante esta^{197,198}.

Devillier P, Dreyfus JF, Demoly P, Calderón MA. A meta-analysis of sublingual allergen immunotherapy and pharmacotherapy in pollen-induced seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *BMC Med.* 2014 May 1;12:71.

Meadows A, Kaambwa B, Novielli N, Huissoon A, Fry-Smith A, Meads C, y cols. A systematic review and economic evaluation of subcutaneous and sublingual allergen immunotherapy in adults and children with seasonal allergic rhinitis. *Health Technol Assess.* 2013 Jul;17(27):vi, xi-xiv, 1-322.

Tsabouri S, Mavroudi A, Feketea G, Guibas GV. Subcutaneous and Sublingual Immunotherapy in Allergic Asthma in Children. *Front Pediatr.* 2017 Apr 21;5:82.

¹⁹⁵ Suárez-Fueyo A, Ramos T, Galán A, Jimeno L, Wurtzen PA, Marin A, y cols. Grass tablet sublingual immunotherapy downregulates the Th2 cytokine response followed by regulatory T-cell generation. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Jan;133(1):130-89.

¹⁹⁶ Durham SR, Yang WH, Pedersen MR, Johansen N, Rak S. Sublingual immunotherapy with once-daily grass allergen tablets: a randomized controlled trial in seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Apr; 117(4):802-9.

¹⁹⁷ Dahl R, Kapp A, Colombo G, de Monchy JG, Rak S, Emminger W et al. Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass allergen tablet for seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:434–440.

¹⁹⁸ Didier A, Melac M, Montagut A, Lhéritier-Barrand M, Tabar A, Worm M. Agreement of efficacy assessments for five-grass pollen sublingual tablet immunotherapy. *Allergy.* 2009 Jan;64(1):166-71.

Por último, una tercera posibilidad es que el tamaño muestral fuera insuficiente. Si bien se realizó un cálculo estadístico inicial, al final no se lograron reclutar los 90 pacientes estimados. De estas hipótesis, lo más probable es que la duración del tratamiento fuera demasiado breve, como se comentará más adelante.

Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en la EVA, entre los grupos activos y el grupo placebo, ni en la especificada por el paciente ni en la evaluada por el investigador. Tampoco se observaron en la calidad de vida, determinada mediante el RQLQ. Estos resultados están en concordancia con falta de eficacia observada con la variable principal.

La prueba de provocación nasal aportó algunos datos interesantes. En principio, se observó que, en todos los sujetos del estudio, considerados conjuntamente, la concentración necesaria para conseguir una prueba positiva se incrementó. Así, en la visita final respecto a la basal, 31 pacientes fueron positivos a una concentración más alta, 12 a una concentración más baja y en 29 no hubo cambio. Esta diferencia estuvo cercana a la significación para los distintos grupos. Cuando se cuantificó de forma numérica esta respuesta, se pudo apreciar una diferencia estadísticamente significativa en el grupo placebo, en el que aumentó la concentración de extracto necesaria para producir una respuesta. Este resultado no resulta fácil de interpretar, pues no era de esperar que el grupo placebo presentase una reducción de la sensibilidad al extracto. Además, este comportamiento del GP impide un correcto análisis de la respuesta a la provocación nasal de los grupos activos. De todos modos, la prueba de provocación nasal no es una prueba que haya sido empleada en muchos

estudios de ITA, habiéndose descrito tanto eficacia en cuanto a la reducción de la dosis necesaria para producir una respuesta^{199,200}.

6.2 Análisis de las inmunoglobulinas

En relación a los pacientes antes del tratamiento se encontró una correlación directa entre la IgE total y la IgE específica frente al *Phleum*. Esto es probablemente debido a que la IgE específica, en estos pacientes, constituye gran parte de la IgE total.

Tras la inmunoterapia, en relación a los niveles de Inmunoglobulinas se observó aumento de la IgE específica frente al *Phleum*. Este aumento fue más ostensible en el grupo que recibió dosis más baja. Del mismo modo se observó un aumento de los niveles de IgG4 en el grupo al que se le administró dosis bajas de inmunoterapia.

El hecho de que no se apreciaran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y el placebo está en consonancia con la falta de eficacia del tratamiento. Sin embargo, sí que parece que se observa un cierto efecto de la ITSL sobre las inmunoglobulinas, que resultó más patente en el G1, observándose un incremento de la IgE y de la IgG4 específicas frente al *Phleum*.

¹⁹⁹ Pfaar O, Barth C, Jaschke C, Hörmann K, Klimek L. Sublingual allergen-specific immunotherapy adjuvanted with monophosphoryl lipid A: a phase I/IIa study. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;154(4):336-44.

²⁰⁰ Scadding GW, Calderon MA, Shamji MH, Eifan AO, Penagos M, Dumitru F, y cols. Immune Tolerance Network GRASS Study Team. Effect of 2 Years of Treatment With Sublingual Grass Pollen Immunotherapy on Nasal Response to Allergen Challenge at 3 Years Among Patients With Moderate to Severe Seasonal Allergic Rhinitis: The GRASS Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2017;317(6):615-625.

A fin de aumentar la potencia estadística, se agruparon los datos de los dos tratamientos, observándose, en este caso, un incremento significativo de la IgE específica frente al *Phleum*, e incrementos no significativos de la IgG e IgG4 específicas. Esto indicaría que, aunque no se ha observado eficacia clínica, el tratamiento ha tenido un cierto efecto inmunológico (más notorio, por cierto, en el grupo de dosis baja). En este sentido, Suárez-Fueyo et al (2014)²⁰¹ en un grupo de 58 individuos con rinitis alérgica que recibieron ITSL (*P pratense*, 75.000 SQ, tabletas sublinguales, 2 años de terapia) se observó que la IgE específica frente al *Phleum* se incrementaba al primer mes de tratamiento, y algo similar sucedía con la IgG4. El incremento resultó más intenso en el caso de la IgE específica, que luego se reduciría progresivamente y mucho más discreto en el caso de la IgG4, que luego se incrementaría en los meses posteriores. Esto podría estar en consonancia con nuestros datos (el tratamiento duró sólo ocho semanas y las determinaciones finales se realizaron a los cuatro meses), por lo que el resultado significativo en el caso de la IgE específica podría deberse a que su incremento es más notable, mientras que no se observó significación para la IgG4, cuyo incremento es mucho menos notorio.

La elevación de los niveles de IgE e IgG4 específicas con la ITSL se ha observado en distintos estudios. Nolte y cols.²⁰², en pacientes con rinoconjuntivitis alérgica por ácaros que recibieron ITSL, encontraron un

²⁰¹ SUÁREZ-FUEYO A, RAMOS T, GALÁN A, JIMENO L, WURTZEN PA, MARIN A Y COLS. GRASS TABLET SUBLINGUAL IMMUNOTHERAPY DOWNREGULATES THE TH2 CYTOKINE RESPONSE FOLLOWED BY REGULATORY T-CELL GENERATION. J ALLERGY CLIN IMMUNOL. 2014 JAN; 133(1):130-8.E1-2.

²⁰² NOLTE H, BERNSTEIN DI, NELSON HS, KLEINE-TEBBE J, SUSSMAN GL, SEITZBERG D, REHM D, KAUR A, LI Z, LU S. EFFICACY OF HOUSE DUST MITE SUBLINGUAL IMMUNOTHERAPY TABLET IN NORTH AMERICAN ADOLESCENTS AND ADULTS IN A RANDOMIZED, PLACEBO-CONTROLLED TRIAL. J ALLERGY CLIN IMMUNOL. 2016 DEC; 138(6):1631-1638.

aumento de la IgE y de la IgG4 específicas frente a los ácaros. Igualmente, en el 2016²⁰³, en un estudio de pacientes con rinitis alérgica al polen del árbol de abedul que recibieron inmunoterapia específica, los autores observaron un aumento precoz de la IgE específica del alérgeno y aumento de la IgG4 específica cuando la IgE específica empezó a disminuir.

En la revisión de Cuppari²⁰⁴, los autores señalan que, en los pacientes que reciben ITSL, la IL-10 induce un cambio en la producción de IgE hacia IgG, actuando sobre las células B, conduciendo a la secreción de IgG1 e IgG4, siendo más pronunciado el aumento de la IgG4 específica, en donde las IgG4 poseen actividad bloqueante para eventos dependientes de IgE; además, los anticuerpos IgG4 específicos del alérgeno pueden competir por el alérgeno con los anticuerpos IgE y, como consecuencia, disminuir la sensibilidad de las células B presentadoras de antígeno y la capacidad de desgranulación de los mastocitos.

En 2016 van de Veen y cols.²⁰⁵ refieren que la respuesta humoral que marca la tolerancia al alérgeno viene caracterizada por un aumento transitorio en la IgE específica de alérgeno, seguido de una disminución de IgE y un aumento gradual de los niveles de anticuerpos IgG específicos, indicando que durante la ITA la

²⁰³ STYLIANOU E, UELAND T, BORCHSENIUS F, MICHELSEN AE, ØVSTEBØ R, MOLLNES TE, SKJØNSBERG OH, AUKRUST P. SPECIFIC ALLERGEN IMMUNOTHERAPY: EFFECT ON IGE, IGG4 AND CHEMOKINES IN PATIENTS WITH ALLERGIC RHINITIS. SCAND J CLIN LAB INVEST. 2016; 76(2):118-27.

²⁰⁴ CUPPARI C, LEONARDI S, MANTI S, FILIPPELLI M, ALTERIO T, SPICUZZA L, RIGOLI L, ARRIGO T, LOUGARIS V, SALPIETRO C. ALLERGEN IMMUNOTHERAPY, ROUTES OF ADMINISTRATION AND CYTOKINE NETWORKS: AN UPDATE. IMMUNOTHERAPY. 2014; 6(6):775-86.

²⁰⁵ VAN DE VEEN W, STANIC B, WIRZ OF, JANSEN K, GLOBINSKA A, AKDIS M. ROLE OF REGULATORY B CELLS IN IMMUNE TOLERANCE TO ALLERGENS AND BEYOND. J ALLERGY CLIN IMMUNOL. 2016 SEP; 138(3):654-65.

IgG4 se eleva. Los anticuerpos IgG4 poseen varias propiedades no inflamatorias incluyendo: baja actividad para activar los receptores Fcγ, incapacidad para activar el complemento y capacidad única para formar anticuerpos biespecíficos y funcionalmente monovalentes a través del intercambio del brazo Fab²⁰⁶; como consecuencia de lo anterior, la IgG4 específica de alérgeno es considerada antiinflamatoria y puede proteger contra respuestas alérgicas por competitividad con IgE por la unión al alérgeno. La idea anterior del aumento temprano de IgE específica y un incremento temprano de IgG4 específica en los mecanismos de la inmunoterapia alérgeno específica, es también observada en Akdis²⁰⁷, quien sustenta la importancia de las células Treg y Breg en la supresión de la inflamación alérgica, además del equilibrio que debe existir entre células Th2 y células Treg en el desarrollo o la supresión de la inflamación alérgica; las células Treg y sus citocinas suprimen las respuestas inmunes de tipo Th2 y teniendo funciones directa o indirectamente sobre las células B induciendo IgG4 e IgA y suprimiendo la IgE; a nivel del endotelio vascular suprimiendo la unión de las células Th2 a los tejidos; suprimiendo directa o indirectamente los mastocitos, basófilos y eosinófilos, además actuando sobre la supresión directa e indirecta de la activación de células epiteliales y propiedades proinflamatorias. Adicionalmente a lo anterior, las células Breg también suprimen las células T efectoras y contribuyen a la síntesis de IgG4.

²⁰⁶ van der Neut Kofschoten M, Schuurman J, Losen M, Bleeker WK, Martinez-Martinez P, Vermeulen E, et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science* 2007; 317:1554-7.

²⁰⁷ Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Mar;133(3):621-31.

En nuestro grupo los resultados encontrados sugieren que los aumentos en los niveles de IgE específica en los primeros 4 meses después de iniciado el tratamiento, va acompañada de aumento de la IgG4 específica, cambios estos que no se observan en el grupo placebo.

6.3 Análisis de los niveles de citocinas

En el estudio del efecto de la inmunoterapia sobre los niveles de citocinas tras el tratamiento se observó una disminución significativa de los niveles de GM-CSF, IL-2 y, más relevante, de IL-10 en los grupos que recibieron IT (dosis baja y dosis alta). Aunque no se observó una significación estadística en relación a la IL-4, es de notar la disminución de sus niveles en los pacientes que recibieron inmunoterapia. Además, se observó una disminución de la IL-2 y de la IL-10 postratamiento cuando se analizaron conjuntamente ambos grupos de pacientes que recibieron inmunoterapia.

El mecanismo de acción de la ITA no está del todo definido, pero parece que en el mismo intervienen anticuerpos bloqueantes, células T reguladoras, células supresoras específicas de alérgeno y cambios en el patrón de las citocinas²⁰⁸. Respecto a la IL-4, se ha publicado que disminuye tras la AIT en los pacientes con rinitis alérgica²⁰⁹ sugiriendo un cambio del perfil de citocinas de Th2 a Th1,

²⁰⁸CUPPARI C, LEONARDI S, MANTI S, FILIPPELLI M, ALTERIO T Y COLS ALLERGEN IMMUNOTHERAPY, ROUTES OF ADMINISTRATION AND CYTOKINE NETWORKS: AN UPDATE. IMMUNOTHERAPY. 2014; 6(6):775-86.

²⁰⁹ Li Y, Li P. The serum level transformation of IFN-gamma, IL-4 and IgE before and after SIT in patients with allergic rhinitis. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.2013; 27(8), 397–399.

que también lo han reportado en modelos murinos^{210,211}. Esto concuerda con los datos que hemos observado, si bien no resultaron significativos en nuestro caso. Respecto a la IL-10, que es producida por los linfocitos T reguladores, se ha observado que su producción se incrementa con la ITSL²¹². Otros artículos también han descrito un aumento de la IL-10 tras la IT^{213,214}. En un estudio de Bohle y cols.²¹⁵, realizado en pacientes con alergia al polen de abedul que recibieron ITSL se observó, después de las primeras 4 semanas de tratamiento un aumento de la IL-10 y disminución de la IL-4 y del INF γ .

Sin embargo, en este estudio se ha observado una reducción de los niveles de IL-10. No obstante, existen datos en la bibliografía que también observan lo mismo. Así, Lu y cols.²¹⁶, encontraron una disminución en la producción de IL10 e IL4 en pacientes pediátricos monosensibilizados a ácaros que recibieron IT y que presentaron buena respuesta a diferencia de los pacientes que presentaron mala respuesta a la IT. Por su parte, Bonvalet y cols.²¹⁷, describieron, en células

²¹⁰SALARI F, VAHEDI F, VARASTEH AR, KETABDAR H, CHAMANI J, SANKIAN M. ENHANCED SUBLINGUAL IMMUNOTHERAPY BY TAT-FUSED RECOMBINANT ALLERGEN IN A MURINE RHINITIS MODEL. *INT IMMUNOPHARMACOL*. 2017 JUL;48:118-125.

²¹¹ Brimnes J¹, Kildsgaard J, Jacobi H, Lund K. Sublingual immunotherapy reduces allergic symptoms in a mouse model of rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2007 Apr;37(4):488-97.

²¹²GUIDA G, BOITA M, SCIRELLI T, BOMMARITO L, HEFFLER E, BADIU I Y COLS. INNATE AND LYMPHOCYTIC RESPONSE OF BIRCH-ALLERGIC PATIENTS BEFORE AND AFTER SUBLINGUAL IMMUNOTHERAPY. *ALLERGY ASTHMA PROC*. 2012 SEP-OCT;33(5):411-5.

²¹³ Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:984-93.

²¹⁴ Fujita H, Soyka MB, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clin Transl Allergy*. 2012;2:2.

²¹⁵ BOHLE B. T CELL RESPONSES DURING ALLERGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY OF TYPE I ALLERGY. *FRONT BIOSCI*. 2008 MAY 1;13:6079-85.

²¹⁶ Lu FM, Chou CC, Chiang BL, Hsieh KH. Immunologic changes during immunotherapy in asthmatic children: increased IL-13 and allergen-specific IgG4 antibody levels. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1998 May; 80(5):419-23.

²¹⁷ Bonvalet M, Moussu H, Wambre E, Ricarte C, Horiot S, Rimaniol AC, Kwok WW, Horak F, de Beaumont O, Baron-Bodo V, Moingeon P. Allergen-specific CD4⁺ T cell responses in peripheral blood do not predict the early onset of clinical efficacy during grass pollen sublingual immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 2012 Dec;42(12):1745-55..

mononucleares de sangre periféricas de pacientes con rinoconjuntivitis alérgica por pólenes que recibieron ITSL a los 2 y 4 meses después de la ITSL una disminución del mRNA de la IL-10 tanto en el grupo placebo como en el grupo tratado, siendo esta disminución más intensa en el grupo activo; cuando confirmaron con los niveles de la citocina observaron una disminución sostenida de la secreción de IL-10 durante la ITSL, alcanzando significado sólo en el grupo activo. Es posible que esta disminución de la IL-10 pueda asociarse al incremento transitorio de la IgE específica que se produce al principio de la ITSL.

En nuestro caso, el descenso detectado en los niveles de IL-10 podría deberse a la prematuridad en la determinación. En este ensayo clínico la pauta de tratamiento consistió en una única fase de 8 semanas de duración y en el grupo de pacientes tratados con IT se detecta un incremento de algunos marcadores. Esta situación se ha explicado en algunos estudios como proceso previo a la desensibilización. Podríamos inferir que en este momento estamos detectando la activación del sistema inmunológico en los estadios iniciales de IT en los que la IL-10 podría ser menor, esta disminución de la IL-10 en el momento inicial podría estar relacionado con el aumento de IgE específica frente al *Phleum* que se observa en los primeros momentos en la inmunoterapia, sin embargo otros marcadores como la IL-4 o la IgG4 podrían tener un patrón temporal distinto y estar ya indicando el posible inicio de la desensibilización en estos pacientes.

Podemos pensar que la presencia del incremento de la IgE específica, asociada a una disminución de la IL-10 correspondería con la respuesta inmunológica en los momentos iniciales de tratamiento con inmunoterapia, siendo un punto

transitorio propio de los momentos iniciales de la misma. Sin embargo, la corta duración del tratamiento puede explicar la no disminución de la IgE específica. Un cambio en el perfil de la IgE puede requerir una duración más prolongada a la exposición.

6.4 Asociación génica

6.4.1 Distribución de snp en la población control

La población de HapMap de Utah (CEU) se ha utilizado como referencia en los estudios de población caucásica debido al origen común de los antepasados procedentes de Europa del Norte y Occidental²¹⁸. La comparación de las distribuciones alélicas con las de nuestra población a efectos descriptivos permitió identificar similitudes en algunas variantes de genes que codifican las citocinas incluidas en este estudio, en especial pos 30,735 T>C de *IL-1RN*, -589 C>T y -33 C>T de *IL-4*, 1092 A>G de *IL-4R*, c25 G>C de *TGFB1* y -238 G>A de *TNFA*. El resto de SNP presentaron frecuencias alélicas que difieren en mayor o menor medida, destacando: -889C>T de *IL1A*, -1098 T>G de *IL4*, c10 T>C de *TGFB1* y -308 G>A de *TNFA* como los SNP con mayores diferencias para la frecuencia alélica en relación a la distribución del alelo mutado.

Lo anterior enseña que los cambios poblacionales han influido en estas distribuciones de distinta forma, incluso en SNP que se localizan en los mismos

²¹⁸ Montpetit A., Nelis M, Laflamme P, Magi R, Ke X, Remm M, Metspalu A. An Evaluation of the Performance of Tag SNPs Derived from HapMap in a Caucasian Population. *PLoS Genetics*. 2006. 2(3), e27. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020027>

genes. Sin embargo, el uso de los datos de la población CEU de Hapmap sigue siendo útil para los estudios de asociación en otras poblaciones caucásicas, siempre teniendo en cuenta ciertas variaciones. Sin embargo, aunque el empleo de esta base a efectos descriptivos resulta de utilidad; consideramos que esta comparación no permite inferir relaciones de asociación con los fenotipos de interés. Esto se debe a que en las bases poblacionales generales no se puede garantizar que los individuos incluidos no presenten la enfermedad o el fenotipo que se está analizando, ya que esas características no han sido expresamente excluidas en esas poblaciones.

Por lo anterior no es aconsejable su empleo para identificar asociaciones génicas en enfermedades de alta prevalencia como la alergia. Para llevar a cabo estudios de asociación génica, es preciso establecer un grupo control específico como referencia en el que se hayan excluido de forma rigurosa las características fenotípicas que se desea analizar en el grupo de pacientes. En este estudio, no empleamos la base CEU de Hapmap para identificar asociaciones génicas sino para identificar las variantes génicas más diferenciales entre ambas poblaciones, resaltando que ninguna de dichas variantes diferenciales se ha visto implicada en los posteriores estudios de asociación realizados con nuestra población control.

6.4.2 Estudio de asociación génica

En el análisis de los niveles séricos de citocinas en los pacientes del ensayo clínico se han identificado modificaciones de las citocinas IL-2 e IL-10 tras la inmunoterapia en relación a la sensibilización. Para confirmar si existe alguna

asociación entre la distribución génica de los SNP de los genes que codifican IL-2 e IL-10 y las características de sensibilización realizamos un estudio de asociación génica comparando dichas distribuciones entre nuestras poblaciones de pacientes no incluidos en el ensayo y controles seleccionados para el estudio génico. En este estudio hemos identificado distintas asociaciones génicas entre las características de sensibilización de los pacientes incluidos en el estudio y los polimorfismos de genes que codifican citocinas.

Sensibilización a los ácaros

En el estudio de genotipado se observó la asociación del SNP -1082 de *IL10* con la presencia de pruebas cutáneas positivas frente a los ácaros. La citocina IL-10 desempeña un papel relevante en la inflamación y en los procesos de inmunorregulación. Se caracteriza por estimular la respuesta inmune humoral e inhibir múltiples citocinas relacionadas con la inmunidad celular y la alergia. Se han descrito varios polimorfismos en la región promotora de *IL10*, probablemente asociados a los niveles de expresión de la proteína, entre ellos -1082 (rs1800896), -819 (rs1800871) y -592 (rs1800872)²¹⁹. En nuestro estudio hemos identificado un incremento de la presencia del alelo G del SNP -1082 *IL10* en los pacientes sensibilizados a los ácaros, no así de los otros dos SNP.

²¹⁹ ESKDALE J, KUBE D, TESCH H, GALLAGHER G. MAPPING OF THE HUMAN IL10 GENE AND FURTHER CHARACTERIZATION OF THE 5' FLANKING SEQUENCE. IMMUNOGENETICS. 1997; 46(2):120-8.

Stavric y cols.²²⁰, detectaron una asociación de este polimorfismo con otros fenotipos atópicos, como la dermatitis atópica; por su parte, Turner y cols.²²¹, comunicaron que la ausencia del alelo "A" en la posición -1082 se asocia con niveles elevados de IL-10. En nuestro estudio, la presencia del alelo G en un porcentaje superior de pacientes sensibilizados podría estar asociada a niveles más elevados de IL-10, lo que podría estar condicionando a su vez la respuesta a la inmunoterapia. Serían necesarios más estudios para poder identificar esta posible respuesta diferencial en los pacientes portadores del alelo G.

También se identificó una asociación discreta con la frecuencia haplotípica, en concreto con los portadores del haplotipo GCC; sin embargo, la representatividad del haplotipo en los pacientes fue muy escasa. Edwards-Smith y col²²²., estimularon *in vitro* células mononucleares de sangre periférica, y detectaron que el haplotipo (GCC) de la región promotora de la *IL10* se asociaba con elevados niveles de IL-10. Estudios de asociación previos²²³ habían identificado una asociación de los diplotipos que combinan GCC y ACC con los niveles de IL-10 en linfocitos de sangre periférica. Todo esto podría indicar que los diplotipos formados por estas tres variantes génicas podrían desempeñar un papel importante en las modificaciones de la respuesta inmunitaria mediada por IL-10,

²²⁰ STAVRIC K, PEOVA S, TRAJKOV D, SPIROSKI M. GENE POLYMORPHISMS OF 22 CYTOKINES IN MACEDONIAN CHILDREN WITH ATOPIC DERMATITIS. IRAN J ALLERGY ASTHMA IMMUNOL. 2012 MAR;11(1):37-50.

²²¹ Turner, D.M., et al., An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. Eur J Immunogenet, 1997. 24(1): p. 1-8.

²²² EDWARDS-SMITH CJ¹, JONSSON JR, PURDIE DM, BANSAL A, SHORHOUSE C, POWELL EE. INTERLEUKIN-10 PROMOTER POLYMORPHISM PREDICTS INITIAL RESPONSE OF CHRONIC HEPATITIS C TO INTERFERON ALFA. HEPATOLOGY. 1999 AUG;30(2):526-30.

²²³ HOFFMANN SC, STANLEY EM, DARRIN COX E, CRAIGHEAD N, DIMERCURIO BS, KOZIOL DE, HARLAN DM, KIRK AD, BLAIR PJ. ASSOCIATION OF CYTOKINE POLYMORPHIC INHERITANCE AND IN VITRO CYTOKINE PRODUCTION IN ANTI-CD3/CD28-STIMULATED PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES. Transplantation. 2001 Oct 27; 72(8):1444-50.

si bien en nuestro caso el diplotipo que se identificó asociado a la sensibilización alérgica (GTC/ATA) se encontraba en muy baja proporción.

Sensibilización a los pólenes

En nuestro estudio también hemos identificado una asociación del alelo mutado 166 *IL2* y la sensibilización a pólenes. La IL-2 es una importante citocina implicada en la proliferación de los linfocitos T activados en las respuestas Th1 y Th2. Su papel relevante se asocia tanto a la muerte celular inducida por activación de linfocitos T y eliminación de células autorreactivas como a la inducción de las células T supresoras. Presenta una estrecha relación estructural y funcional con la IL-5 induciendo la activación y proliferación de las células T; el balance entre IL-5 e IL-2 contribuye al control del recuento de células T. Este balance también contribuye al control de la autotolerancia pero de forma diferencial. La citocina IL-2 se asocia a las células Th1 mientras que la IL-5 se transcribe en células epiteliales y monocitos. El gen *IL2* se considera candidato en las enfermedades alérgicas, en este sentido, el SNP localizado en posición 166 del gen da lugar a una variante sinónima. La importancia de esta variante radica en que se encuentra en una región ESE (*exonic splicing enhancer*) que potencia el denominado ajuste o “corte y empalme”. Por ello se cree que este SNP podría desempeñar un papel importante en el control de la expresión génica. En nuestro estudio se ha identificado una asociación con la presencia de pruebas cutáneas positivas a pólenes, en concreto un incremento de la

frecuencia del alelo mutado T. Christensen y cols²²⁴., publicaron una asociación del SNP en posición 166 con la presencia de pruebas cutáneas positivas. El análisis molecular les permitió concluir que la presencia de este alelo podría estar inactivando un potencial sitio de ajuste y contribuir a la regulación de la expresión de IL-2; sin embargo, existe cierta controversia a este respecto, por lo que otros factores pueden estar influyendo en la expresión génica de esta citocina²²⁵.

Sensibilización a epitelios

En el caso de la sensibilización a los epitelios identificamos una asociación con dos SNP; -330 de *IL2* e -1082 de *IL10*. Como ya se ha comentado, ambas citocinas han sido ampliamente asociadas al control de la regulación inmunológica. El polimorfismo -330 se localiza en la región promotora, en una zona que se ha identificado de unión a factores de transcripción. Se ha propuesto que la presencia de este polimorfismo en homocigosis tiene como consecuencia un incremento en la expresión de la IL-2²²⁶. En nuestro estudio se ha identificado una mayor presencia del alelo no mutado T en los pacientes sensibilizados. Christensen y cols., analizaron este SNP en pacientes con distintos fenotipos atópicos en una población danesa y encontraron un incremento en la transmisión del alelo T a la descendencia en los pacientes. Este alelo T se ha asociado a la generación de un sitio de unión de factores de transcripción de regulación

²²⁴Christensen U, Haagerup A, Binderup HG, Vestbo J, Kruse TA, Børglum AD. Family based association analysis of the IL2 and IL15 genes in allergic disorders. *Eur J Hum Genet.* 2006 Feb; 14 (2):227-35.

²²⁵MOVAHEDI M, MAHDAVIANI SA, REZAEI N, MORADI B, DORKHOSH S, AMIRZARGAR AA. IL-10, TGF-BETA, IL-2, IL-12, AND IFN-GAMMA CYTOKINE GENE POLYMORPHISMS IN ASTHMA. *J ASTHMA.* 2008 NOV;45(9):790-4..

²²⁶Williams, T., et al., *Two regions within the human IL-2 gene promoter are important for inducible IL-2 expression.* *J Immunol,* 1988. 141(2): p. 662-666.

negativa, TCF11/MafG, que, según la predicción *in silico* provocaría menos expresión de la interleucina 2 y una desviación del equilibrio Th1-Th2 hacia Th2. Hoffman y cols.,²²⁷ estudiaron los niveles de expresión de IL-2 en función del genotipo de *IL2* -330 en células en cultivo detectando un sensible aumento de expresión en los pacientes GG (no portadores del alelo T). En nuestro estudio, además, detectamos una asociación del diplotipo TT TT del gen de *IL2* (-330 / 166) con la sensibilización a pólenes y a epitelios. En este caso la contribución de la posición parece tener menos fuerza en dicha asociación.

En estos pacientes también identificamos asociación con el SNP -1082 del gen *IL10*. Se ha descrito que los SNP en la región promotora de *IL10* influyen en la susceptibilidad y gravedad de enfermedades autoinmunes, infecciosas y neoplásicas. Como se ha comentado previamente, Stavric y col²²⁸., detectaron una asociación con dermatitis atópica; y Turner y cols., comunicaron que la ausencia del alelo "A" en la posición -1082 se asociaba con niveles elevados de IL-10.

Monosensibilización y polisensibilización

Recientemente se considera que el patrón de sensibilización puede determinar características de la enfermedad alérgica, y se ha llegado incluso a hablar de un

²²⁷ Hoffmann, S.C., y cols. *Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes*. *Transplantation*, 2001. 72(8): p. 1444-50.

²²⁸ STAVRIC K, PEOVA S, TRAJKOV D, SPIROSKI M. GENE POLYMORPHISMS OF 22 CYTOKINES IN MACEDONIAN CHILDREN WITH ATOPIC DERMATITIS. *IRAN J ALLERGY ASTHMA IMMUNOL*. 2012 MAR; 11(1):37-50. DOI: 011.01/IJAAI.3750.

fenotipo diferente atendiendo a la mono o polisensibilización^{229 230 231}. Últimamente se ha incidido en la distinta caracterización fenotípica del paciente monosensibilizado respecto al polisensibilizado. En concreto, se ha descrito que ambos grupos presentan características clínicas diferenciales y podrían constituir grupos clínicos distintos²³². De hecho, diversos estudios sugieren que los pacientes polisensibilizados tienen una enfermedad atópica más grave y peor calidad de vida que los monosensibilizados²³³ y no solo una reactividad cruzada a aeroalérgenos similares^{234,235}. En nuestro estudio, los pacientes monosensibilizados presentaron niveles basales de IL-10 y de IL-2 más elevados que los polisensibilizados y además reaccionaron a la inmunoterapia con disminución de IL-2, de IL-10, y aumento de IgE *Phleum*, si bien los mejores poderes estadísticos se obtuvieron para IL-10. En el estudio de Li y cols.²³⁶, los pacientes con rinitis alérgica monosensibilizados presentaban un mayor porcentaje de células T CD4+ productoras de IL-10 antes de la inmunoterapia específica (basales) frente a controles (pacientes sin alergia) y una elevación de estas células después de la inmunoterapia, observando que la inmunoterapia

²²⁹ Cirillo I, Vizzaccaro A, Klersy C, Baiardini I, Marseglia GL, Canonica GW, et al. Quality of life and polysensitization in young men with intermittent asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005;94(6):640-3.

²³⁰ de Jong AB, Dikkeschei LD, Brand PL. Sensitization patterns to food and inhalant allergens in childhood: a comparison of non-sensitized, monosensitized, and polysensitized children. *Pediatr Allergy Immunol* 2011; 22(2):166-71.

²³¹ Guerra S AL, Blasi F, Cottini M. Age at symptom onset and distribution by sex and symptoms in patients sensitized to different allergens. *Allergy* 1998 ;53(9):7.

²³² Ibid.

²³³ Cirillo I, Vizzaccaro A, Klersy C, Baiardini I, Marseglia GL, Canonica GW, et al. Quality of life and polysensitization in young men with intermittent asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005;94(6):640-3.

²³⁴ Guerra S AL, Blasi F, Cottini M. Age at symptom onset and distribution by sex and symptoms in patients sensitized to different allergens. *Allergy* 1998 ;53(9):7.

²³⁵ de Jong AB, Dikkeschei LD, Brand PL. Sensitization patterns to food and inhalant allergens in childhood: a comparison of non-sensitized, monosensitized, and polysensitized children. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;22(2):166-71.

²³⁶ Li CW, Lu HG, Chen DH, Lin ZB, Wang DY, Li TY. *In Vivo* and *In Vitro* Studies of Th17 Response to Specific Immunotherapy in House Dust Mite-Induced Allergic Rhinitis Patients. Doherty TM, ed. *PLoS ONE*. 2014; 9(3):e91950. doi:10.1371/journal.pone.0091950.

específica era capaz de cambiar los linfocitos de Th2 a Th1, paralelamente a la proporción aumentada de células productoras de IL10^{237 238 239}.

Merece destacar que también se observaron diferencias en el comportamiento de los pacientes monosensibilizados y polisensibilizados después de la IT: los pacientes monosensibilizados presentaron variaciones en los niveles de IL-2 e IL-10, e IgE frente al *Phleum*, pero no así los polisensibilizados. La ausencia de diferencias tras tratamiento con IT en los pacientes polisensibilizados podría deberse a una menor respuesta inmunológica al presentar sensibilizaciones a otros alérgenos no recogidos en la vacuna, si bien al ser un grupo menor podría no tener un tamaño suficiente para evidenciar estos efectos.

Algunos de los poderes estadísticos, como el de IL-2 y el de la IgE específica frente al *Phleum* fueron muy bajos por lo que se necesitan estudios en poblaciones más amplias para confirmar estos resultados.

Li y cols.²⁴⁰ valoraron la eficacia de la inmunoterapia sublingual en niños mono y polisensibilizados con enfermedades alérgicas respiratorias, sin encontrar diferencias significativas en la eficacia clínica, atribuyendo el resultado a una

²³⁷ Nouri-Aria KT, Wachholz PA, Francis JN, Jacobson MR, Walker SM, et al. (2004) Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol* 172: 3252–3259.

²³⁸ Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C y cols. 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.

²³⁹ Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden Cy cols. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol*. 1995; 154: 4187–4194.

²⁴⁰ Peng Li, MBBS, Qi Li, Zhenghua Huang, MM1, Wenbo Chen, MM, Yueqian Lu, MM2 and Man Tian. Efficacy and safety of house dust mite sublingual immunotherapy in monosensitized and polysensitized children with respiratory allergic diseases. *International Forum of Allergy & Rhinology*, Vol. 0, No. 0, August 2014.

posible reactividad cruzada del alérgeno; además indicaron que la ITSL no solo puede inducir tolerancia al alérgeno clínicamente más relevante, sino que además podría activar células T regulatorias inducibles, las cuales ejercerían un efecto regulatorio inmunológico no específico parcialmente o respuesta inmune a antígenos no relacionados. En nuestro estudio hemos encontrado una asociación de la polisensibilización con la presencia del alelo mutado del SNP 166 del gen *IL2*. Como se ha comentado previamente, este SNP se ha asociado a pruebas cutáneas positivas y puede contribuir a la regulación de los niveles de IL-2.

Este estudio presenta dos limitaciones que merece la pena destacar. La primera es que debido a que valora los efectos de la IT en los estadios precoces de aplicación, la ausencia de eficacia no puede atribuirse exclusivamente al corto periodo de tiempo y sería necesario un estudio ampliado para descartar una potencial ausencia de eficacia de la misma. La segunda es que, aunque en este estudio hemos realizado un análisis de las variantes de los genes que codifican las citocinas implicadas en los mecanismos inmunogénicos de la IT, para analizar los efectos de las distribuciones de las frecuencias alélicas sobre los niveles de expresión de las citocinas estos estudios génicos se deberían poder realizar en los mismos pacientes del ensayo clínico.

En definitiva, en este estudio se han identificado variaciones en los niveles de inmunoglobulinas y de citocinas implicadas en la respuesta inmunogénica a la IT en los estadios precoces de la misma. Así mismo se han identificado asociaciones con la distribución de los SNP de los genes que codifican estas

citocinas y las características de sensibilización de los pacientes, que pueden influir en la expresión de las mismas y por lo tanto deberían tenerse en cuenta en la interpretación de las variaciones identificadas tras la IT. Sería muy interesante realizar estudios posteriores que permitan profundizar en la implicación de las variantes génicas en la inmunoterapia.

CONCLUSIONES

7 CONCLUSIONES

1. En este estudio no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo placebo y los grupos de tratamiento en la variable principal de eficacia del ensayo de Inmunoterapia, en los estadios iniciales de la misma; sin embargo no se puede excluir que la ausencia de diferencias no pueda ser atribuida a una ausencia de eficacia de la terapia, por lo que proponemos que los ensayos clínicos se desarrollen en un periodo de tiempo que permita analizar el efecto a más largo plazo.

2. Se observa un efecto de la ITSL sobre las Inmunoglobulinas, en concreto sobre la IgE e IgG4 específicas, lo que podría estar indicando una modulación inicial de la misma sobre el sistema inmunológico.

3. Se identifica una disminución de algunas citocinas, en concreto de la IL-2 e IL-10 tras el tratamiento, que puede poner de manifiesto una respuesta más precoz de esas citocinas en relación con la ITSL.

4. El estudio descriptivo de la distribución de las frecuencias alélicas de nuestra población respecto a la población de Hapmap CEU muestra un distinto patrón en la distribución para algunas variantes génicas de los genes *IL1A*, *IL4*, *TGFB1* y *TNFA*. Ninguno de estos genes codifica citocinas con resultados diferenciales en el estudio de asociación realizado con pacientes y controles en nuestra población.

5. En el estudio de asociación realizado con los casos y controles de nuestra población se observa una asociación entre las variantes de los genes que codifican las citocinas IL-2 e IL-10 y algunos patrones de sensibilización alérgica; en concreto, la distribución alélica de -1082 A>G de *IL 10* con la sensibilización a ácaros y a epitelios, de -330 T>G de *IL2* con la sensibilización a epitelios y de 166 G>T de *IL2* con la sensibilización a pólenes.

6. En este estudio se identifica una asociación génica de la variante 166 G>T del gen *IL2* con la polisensibilización.

7. Las diferencias encontradas en el estudio de asociación para los genes *IL2* e *IL10* en relación con la sensibilización a pólenes y con la polisensibilización podrían estar implicadas en la modulación de los niveles de expresión de estas citocinas. Para concretar su posible papel en la respuesta observada de las citocinas a la IT proponemos la inclusión de las variables génicas en los ensayos clínicos de IT con el fin de identificar posibles marcadores farmacogenéticos de respuesta.

ANEXO

Anexo 1 Descriptiva de los niveles séricos de los distintos parámetros inmunoserológicos evaluados en la visita basal y la visita 4.

Parámetros	Estadístico	G1			G2			GP		
		Basal	Final	Valor p*	Basal	Final	Valor p*	Basal	Final	Valor p*
IgE total	n	21	21		26	26		23	23	
	Media (DT)	282,2(382,8)	354,1(543,9)		277,8(318,5)	332,1(409,4)		278,7(296,2)	284,7(278,0)	
	95% IC	(107,9, 456,4)	(106,5, 601,7)		(149,1, 406,4)	(166,7, 497,4)		(150,6, 406,8)	(164,5, 404,9)	
	Media									
	Mediana	132,0	162,0		166,5	187,5		153,0	211,0	
Q1/Q3	(75,9, 221,0)	(111,0, 249,0)		(108,0, 249,0)	(106,0, 347,0)		(65,6, 299,0)	(110,0, 418,0)		
Min/Max	(20, 1376,0)	(22, 1804,0)	0,1244	(6, 1,205,0)	(3, 1664,0)	0,1182	(8, 1009,0)	(110,0, 418,0)	0,7701	
IgE Phleum	n	21	21		26	26		23	23	
	Media (DT)	79,5(121,5)	136,3 (242,1)		67,3 (94,1)	66,3 (95,6)		74,3 (90,1)	69,4 (64,9)	
	95% IC	(24,2, 134,8)	(26,1, 246,5)		(29,3, 105,3)	(27,6, 104,9)		(35,3, 113,2)	(41,3, 97,4)	
	Media									
	Mediana	26,2	32,7		31,2	38,4		38,5	46,4	
Q1/Q3	(15,2, 73,9)	(19,0, 73,1)		(14,7, 77,6)	(21,7, 68,2)		(11,5, 82,0)	(15,4, 98,3)		
Min/Max	(4, 502,0)	(5, 956,0)	0,028	(1, 364,0)	(0, 406,0)	0,8985	(2, 290,0)	(2, 245,0)	0,4912	
IgG Phleum	n	18	19		23	23		23	22	
	Media (DT)	6,14 (6,78)	18,13 (59,81)		7,74 (12,08)	5,33 (5,55)		4,98 (4,11)	5,11 (3,82)	
	95% IC	(2,77, 9,51)	(-10,70, 46,95)		(2,51, 12,96)	(2,93, 7,73)		(3,20, 6,75)	(3,42, 6,81)	
	Media									
	Mediana	4,32	4,12		4,00	3,42		3,35	3,98	
Q1/Q3	(3,48, 5,79)	(3,40, 5,08)		(3,11, 7,00)	(2,99, 6,18)		(2,98, 5,18)	(3,39, 4,29)		
Min/Max	(2,5, 32,20)	(2,7, 265,00)	0,3043	(2,2, 58,40)	(2,1, 29,30)	0,3257	(2,0, 21,00)	(2,5, 19,90)	0,9862	
IgG4 Phleum	n	20	19		26	26		23	22	
	Media (DT)	0,29 (0,23)	0,34 (0,27)		0,32 (0,43)	0,35 (0,51)		0,43 (0,71)	0,32 (0,26)	
	95% IC	(0,20, 0,45)	(0,20, 0,47)		(0,16, 0,55)	(0,13, 0,57)		(0,01, 3,20)	(0,2, 0,44)	
	Media									
	Mediana	0,21	0,30		0,22	0,21		0,19	0,22	
Q1/Q3	(0,16, 0,35)	(0,15, 0,36)		(0,10, 0,39)	(0,09, 0,36)		(0,11, 0,70)	(0,12, 0,44)		
Min/Max	(0,03, 0,9)	0,04, 0,99	0,033	(0,04, 2,45)	(0,03, 2,45)	0,783	(0,0, 3,2)	(0,02, 0,88)	0,839	

Las medias de la IgE total y la IgE *Phleum* son KU/L; las medias de la IgG *Phleum* e IgG4 *Phleum* son en g/L

