



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología celular, Genética y Fisiología

Programa de doctorado de Biotecnología avanzada

Tesis doctoral

**“Estudio de los mecanismos inmunológicos
implicados en la inmunoterapia específica con
alérgenos. Papel de las células T reguladoras y
efectoras específicas”**

Miguel González Visiedo

2018



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Miguel González Visiedo

 <http://orcid.org/0000-0001-8912-6619>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Doña **Cristobalina Mayorga Mayorga**, doctora en biología e investigadora senior del grupo de investigación de alergia del Hospital Regional Universitario de Málaga certifica:

Que el trabajo que presenta Don **Miguel González Visiedo**, con el título **“Estudio de los mecanismos inmunológicos implicados en la inmunoterapia específica con alérgenos. Papel de las células T reguladoras y efectoras específicas”** ha sido realizado en el laboratorio de investigación del Hospital Regional Universitario de Málaga bajo mi dirección y considero que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido a juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, lo firmo en Málaga a de de 2018

Fdo. Dra. Cristobalina Mayorga Mayorga



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Doña **María José Torres Jaén**, Doctora en Medicina y Cirugía, directora de la Unidad de Gestión Clínica de Alergología del Hospital Regional Universitario de Málaga y profesora asociada al departamento de medicina de la Universidad de Málaga certifica:

Que el trabajo que presenta Don **Miguel González Visiedo**, con el título **“Estudio de los mecanismos inmunológicos implicados en la inmunoterapia específica con alérgenos. Papel de las células T reguladoras y efectoras específicas”** ha sido realizado en el laboratorio de investigación del Hospital Regional Universitario de Málaga bajo mi dirección y considero que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido a juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, lo firmo en Málaga a de de 2018

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Fdo. Dra. María José Torres Jaén



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Don **Manuel Cifuentes Rueda**, doctor en Biología, Catedrático de Universidad del área de Fisiología del Departamento de Biología celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga, ACREDITA:

Que el trabajo que presenta Don **Miguel González Visiedo**, con el título “**Estudio de los mecanismos inmunológicos implicados en la inmunoterapia específica con alérgenos. Papel de las células T reguladoras y efectoras específicas**” ha sido realizado en el laboratorio de investigación del Hospital Regional Universitario de Málaga bajo mi TUTORIZACIÓN y considero que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido a juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmo en Málaga a de de 2018





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Yo, **Miguel González Visiedo**, declaro que soy autor del presente trabajo de investigación cuyo título es **“Estudio de los mecanismos inmunológicos implicados en la inmunoterapia específica con alérgenos. Papel de las células T reguladoras y efectoras específicas”** y que ha sido realizado en el laboratorio de investigación del Hospital Regional Universitario de Málaga bajo la codirección de las Dras. **Cristobalina Mayorga Mayorga** y **María José Torres Jaén**, y de la tutela del Dr. **Manuel Cifuentes Rueda**.

Y para que así conste, firmo en Málaga a de de 2018

Fdo. Miguel González Visiedo





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Los resultados obtenidos en este trabajo han dado lugar a los siguientes artículos científicos y comunicaciones a congresos:

Artículos científicos:

- **González M**, Doña I, Palomares F, Campo P, Rodríguez MJ, Rondón C, Gómez F, Fernández TD, Perkins JR, Escribese MM, Torres MJ, Mayorga C. “*Dermatophagoides pteronyssinus* immunotherapy changes the T-regulatory cell activity”. Sci Rep. 2017 Sep 20; 7(1):11949. doi: 10.1038/s41598-017-12261-2. PMID: 28931869
- Gómez E, Fernández TD, Doña I, Rondon C, Campo P, Gomez F, Salas M, **González M**, Perkins JR, Palomares F, Blanca M, Torres MJ, Mayorga C. “ Initial immunological changes as predictors for house dust mite immunotherapy response”. Clin Exp Allergy. 2015 Oct;45(10):1542-53. doi: 10.1111/cea.12578. PMID: 26032922.
- Fernández TD, Gómez E, Doña I, Campo P, Rondon C, **González M**, Gomez F, Palomares F, Salas M, Blanca M, Mayorga C, Torres MJ. “Differential Plasma-cell evolution is linked with *Dermatophagoides pteronyssinus* immunotherapy response”. Sci Rep. 2015 Sep 29;5:14482. doi: 10.1038/srep14482. PMID: 26416023.

Comunicaciones a congresos:

- **González M**, Palomares F, Doña, Torres MJ, Gomez F, Rodriguez MJ, Molina A, Campo P, Rondon C, Mayorga C. “Effect of *Dermatophagoides pteronissinus* immunotherapy on T regulatory cell subpopulation”. Annual meeting of American Academy of Allergy and Asthma Immunology, Atlanta, EEUU, 2017.
- **González M**, Doña I, Palomares F, Campo P, Rodriguez MJ, Rondon C, Gomez F, Galindo L, Perkins JR, Torres MJ, Mayorga C. “Changes in T-regulatory cells activity during *Dermatophagoides*

pteronyssinus immunotherapy". Annual meeting of European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Helsinki, Finlandia, 2017.



La realización de este trabajo ha sido posible gracias a las siguientes fuentes de financiación:

- Contrato predoctoral con cargo al Proyecto de Excelencia CTS-7433.
- Proyecto de investigación de Excelencia de la Junta de Andalucía CTS-7433.
- Proyecto de investigación del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III (PI12/02481).
- Proyecto de investigación del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III (PI15/02256).
- Proyecto de investigación del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III (PI15/00559).
- Red temática de investigación cooperativa en salud (RETICS) RIRAAF del fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III cofinanciada con Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (RD07/0064) (RD12/0013/0001).
- Red temática de investigación cooperativa en salud (RETICS) ARADyAL del fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III cofinanciada con Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (RD16/0006/0001) (RD012/0013).
- Proyecto de investigación de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (PI-0542-2010)





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Agradecimientos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Uno no sabe que le depara el destino, aunque muchos de los acontecimientos futuros dependen de las decisiones del pasado. Es por esto que desde que terminé la licenciatura de biología, un sueño me rondaba por la mente: ser doctor. Pero era eso, un sueño lejano, con un camino duro y largo que recorrer. Pero no hay camino imposible y paso a paso se puede llegar a la meta.

Es al inicio de este camino donde me encontré con Lina y Pepa. Ellas me han iluminado con su sabiduría y me han guiado con su saber hacer hasta la meta, haciendo el trayecto más fácil y ameno. Es por esto que quiero agradecerles su ayuda, apoyo y confianza. Gracias. También agradecer a Miguel Blanca por introducirme en el fascinante mundo de la investigación de las enfermedades alérgicas.

Como en toda buena película que se precie, los actores secundarios (y no tan secundarios) tienen una gran importancia y repercusión en el resultado final del argumento. Me estoy refiriendo a mis compañeros de laboratorio, sin los cuales este camino habría sido mucho más difícil y aburrido. Muchos de ellos, además de compañeros son ya amigos. Gracias M^a Carmen, Ana Molina, M^a José, Rubén, Raquel, Ángela, Francis, Jose, Tahía, Adri, Maribel, Jimmy, Alba, Rakel, Kike, Ailec, Conchi, Pepe, Rosa, Pablo, Antonio, Juanmi, Ana Aranda, Jesús, Ana Lago, Eva...(seguro que se me olvida alguien). Para mí todos habéis sido ganadores del óscar al “mejor actor secundario de la tesis”.

Tampoco me olvido de mis compañeros “de arriba”, los de las consultas de alergia. Junto con ellos formamos la “gran familia” de Alergia. Sin ellos, tampoco hubiera sido posible elaborar esta tesis. Gracias a Gádor, Ibon, Paqui, Luisa, Inma, Natalia, María, Carmen, Paloma, Mara y todos los demás.

Muchas veces, hay cosas que se dan por hecho, sin darle ningún valor aparente. Es el caso de mi tutor, el Dr. Manuel Cifuentes. Ha sabido ayudarme, aconsejarme e ilustrarme en todo momento. Esto tiene un gran valor, por lo que

no tengo nada más que agradecerle su inmenso trabajo y profesionalidad. Muchas gracias Manolo.

Uno de los puntos más importantes de este apartado (si no el que más) es mi familia. Un hombre no es nada si olvida de dónde viene. Todos y cada uno de vosotros me habéis animado, apoyado y confiado en mí, por lo que un pedacito importante de esta tesis os corresponde. Gracias a mis padres, mi hermano, mis abuelos y mis tíos. Gracias a todos los que estáis aquí y a los que no, a todos. Sin vosotros no sería lo que soy

Hay un dicho que dice que detrás de un gran hombre hay una gran mujer. Detrás de mí, además de eso, hay una amiga, compañera, confidente y alma gemela. No puedo ni podré nunca agradecerte todo el apoyo, ayuda y mil cosas más (que son imposibles de cuantificar) que me has dado. Gracias, gracias y mil gracias Maite.

Finalmente y creo que el más importante de todos, quiero hacer un agradecimiento más pequeño (en tamaño), pero no por ello menos intenso. Es el que me alegra el día cuando llego a casa, el que siempre me arranca una sonrisa y con el que las horas de juego se hacen cortas. Hugo, se que aún eres muy pequeño para saber qué es este libro que he escrito, pero solo quiero que sepas que, por muy inalcanzable que parezca un sueño, si te esfuerzas, puedes llegar a cumplirlo. Te quiero enano.

Resumen

Dentro de las reacciones alérgicas originadas en las vías respiratorias, la rinitis alérgica (RA) es la que cobra mayor importancia en cuanto a su incidencia en la población. Entre los alérgenos más prevalentes en esta patología se encuentran los pólenes, epitelios animales hongos y ácaros del polvo doméstico, entre otros, siendo este último de gran interés en nuestra zona.

El tratamiento de la RA va encaminado a tratar la inflamación alérgica subyacente, que debe ser controlada para prevenir su cronificación. Entre los diferentes métodos actuales, el tratamiento inmunomodulador pretende desviar el patrón de la respuesta efectora desde una reacción alérgica tipo Th2 hacia una respuesta tolerante tipo Th0/1 con la generación de células T reguladoras (Treg) con capacidad supresora de células T efectoras. Este tratamiento es el único que ha demostrado ser efectivo modificando la etiopatogenia de la enfermedad.

Éstos son tratamientos largos y costosos que no siempre muestran una respuesta eficaz. Por ello, la identificación de biomarcadores de eficacia que determine la respuesta y el grado de protección es uno de los principales objetivos que proporcionaría una herramienta eficaz al clínico a la hora de tomar decisión respecto al tratamiento del paciente.

Por otro lado, y a pesar del papel principal otorgado a las Treg en la inducción de una respuesta de tolerancia durante una IT, hoy en día se desconoce el mecanismo subyacente a través del cual este tipo celular ejerce su función, existiendo resultados contradictorios sobre el tema.

Para responder a estas cuestiones, en esta tesis doctoral se ha determinado el perfil de reactividad de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T y B en los pacientes respondedores y no respondedores a la IT frente al ácaro del polvo *Dermatophagoides pteronissinus* (DP). También se ha analizado los cambios en funcionalidad de esta las células Treg generadas

durante el tratamiento y su papel en la inducción de la tolerancia en los pacientes respondedores.

Como resultado se ha demostrado que los pacientes clínicamente respondedores a la IT poseen de inicio un perfil de alta reactividad mayor que los no respondedores. Y además es el que en el que se observan mayores cambios con una disminución de las subpoblaciones efectoras (T y B) con un patrón Th2 en favor de un aumento de las subpoblaciones Th1 y Treg.

Por otro lado, se ha demostrado que la IT induce cambios funcionales en células Treg con una mayor capacidad supresora de células efectoras por lo que se confirma su papel importante en el restablecimiento de la tolerancia inmunológica. De los diferentes mecanismos supresores que pueden tener las Treg en este estudio, se ha demostrado que dicha actividad se encuentra mediada por la producción de IL-10.

Índice



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ABREVIATURAS	27
ÍNDICE DE TABLAS	35
ÍNDICE DE FIGURAS	37
I. INTRODUCCIÓN	41
1. ENFERMEDADES ALÉRGICAS	43
1.1. <i>Definición</i>	43
1.2. <i>Mecanismos generales de las enfermedades alérgicas</i>	43
1.3. <i>Conceptos inmunológicos relacionados con las reacciones alérgicas inmediatas o de tipo I: la IgE</i>	49
1.3.1. Estructura general	50
1.3.2. Síntesis y concentración sérica	51
1.3.3. Síntomas clínicos de las reacciones mediadas por IgE	52
2. RINITIS	53
2.1. <i>Clasificación de la rinitis</i>	53
2.1.1. Rinitis no alérgica	54
2.1.2. Rinitis alérgica	54
2.2. <i>Epidemiología de la rinitis alérgica</i>	55
2.3. <i>Factores de riesgo de la rinitis alérgica</i>	56
2.4. <i>Fisiopatología de la rinitis alérgica</i>	58
2.4.1. Células implicadas en la respuesta durante la fase temprana en rinitis alérgica.....	61
2.4.2. Alérgenos implicados en la rinitis alérgica.....	71
2.5. <i>Diagnóstico</i>	75
2.5.1. Diagnóstico <i>in vivo</i>	76
2.5.2. Métodos <i>in vitro</i>	78
2.6. <i>Tratamiento de la rinitis alérgica</i>	79
2.6.1. Evitación	79
2.6.2. Tratamiento sintomático	79
2.6.3. Tratamiento inmunomodulador	80
2.7. <i>Mecanismo inmunológico implicado en la IT específica a aeroalérgenos</i>	81
II. JUSTIFICACIÓN	85

III. OBJETIVOS	91
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	95
1. DISEÑO DEL ESTUDIO	97
1.1. <i>Ámbito</i>	97
1.2. <i>Selección de sujetos</i>	97
1.2.1. Normas éticas.....	98
1.3. <i>Descripción de la IT</i>	99
1.3.1. Calendarios de dosis.....	99
1.3.2. Evolución clínica de los pacientes.....	100
2. METODOLOGÍA.....	101
2.1. <i>Pruebas in vivo</i>	101
2.1.1. Pruebas cutáneas e intradérmicas.....	101
2.1.2. TPN y rinometría acústica	102
2.2. <i>Pruebas in vitro</i>	103
2.2.1. Recogida de muestras y almacenamiento.....	103
2.2.2. Determinación humoral de IgE total, y de IgE e IgG4 específicas a DP mediante ImmunoCAP	104
2.2.3. Determinación de las células secretoras de IgG4 mediante ELISpot	106
2.2.4. Test de activación de basófilos (TAB) durante la ITSC-DP.....	107
2.2.5. Estudio del fenotipo de subpoblaciones celulares durante la ITSC-DP109	
2.2.6. Estudio de la expresión génica de factores de transcripción en PBMC en presencia del alérgeno.	113
2.2.7. Determinación de la producción de citoquinas.	117
2.2.8. Separación inmunomagnética de subpoblaciones de células T (Tef y Treg)	118
2.2.9. Cultivos celulares para analizar la funcionalidad de Treg.....	119
2.2.10. Fenotipado celular de estudios funcionales de Treg.....	119
2.2.11. Estudio de la proliferación celular de linfocitos mediante el marcaje de CFSE	120
2.2.12. Determinación del mecanismo de supresión de las Treg.....	122
2.3. <i>Análisis estadístico</i>	122
V. RESULTADOS	123

1.	CARACTERÍSTICAS Y RESPUESTA CLÍNICA DE LOS PACIENTES.	125
2.	DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS DURANTE LA ITSC-DP	126
2.1.	<i>Cambios en los niveles de inmunoglobulinas séricas estudiadas durante la ITSC-DP.....</i>	127
2.2.	<i>Determinación del nivel de células productoras de IgG4 mediante ELISpot</i>	128
3.	CAMBIOS CELULARES DURANTE LA ITSC-DP EN LA REACTIVIDAD DEL BASÓFILO Y EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS T Y B.	129
3.1.	<i>Perfil de reactividad del basófilo mediante el test de activación de basófilos.....</i>	130
3.1.1.	Análisis de la concentración óptima mediante curvas dosis-respuesta	130
3.1.2.	Análisis de los cambios de la reactividad del basófilo.....	130
3.2.	<i>Cambios en las subpoblaciones celulares de linfocitos T (efectores y reguladores) tras un año de ITSC-DP.....</i>	131
3.2.1.	Análisis de cambios en la frecuencia de subpoblaciones de linfocitos T específicas frente a Der p 1 durante ITSC-DP.....	131
3.2.2.	Análisis de la expresión génica de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T.....	133
3.2.3.	Determinación de la producción de citoquinas.	134
3.3.	<i>Cambios en las subpoblaciones celulares de linfocitos B durante un año de ITSC-DP.....</i>	135
3.3.1.	Análisis de cambios en la frecuencia de subpoblaciones de linfocitos B durante ITSC-DP	135
4.	ESTUDIOS FUNCIONALES DE CÉLULAS T REGULADORAS TRAS LA ITSC	139
4.1.	<i>Fenotipado celular.....</i>	140
4.2.	<i>Estudio de la capacidad supresora de las Treg sobre la respuesta proliferativa de las subpoblaciones de linfocitos T efectores (Th1, Th2 y Th9) y capacidad de restablecimiento del control de la respuesta alérgica.....</i>	142
4.3.	<i>Estudio del mecanismo de supresión de las Treg mediante el uso de anticuerpos bloqueantes.</i>	143
VI.	DISCUSIÓN	147

VII. CONCLUSIONES	161
VIII. ANEXOS	165
ANEXO 1. DOCUMENTO DE APROBACIÓN DEL ESTUDIO POR PARTE DEL COMITÉ DE ÉTICA	167
ANEXO 2. DOCUMENTO DE INFORMACIÓN DE LA IT PARA EL PACIENTE.	168
ANEXO 3. DOCUMENTO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO.....	171
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	177

Abreviaturas



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Abreviaturas

AAAAI	Academia Americana de Alergología, Asma e Inmunología (del inglés "American Academy of Allergy Asthma & Immunology")
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
Alt a	Componente molecular del hongo <i>Alternaria</i> (<i>Alternaria alternata</i>)
AMPC	Adenosin monofosfato cíclico
AP	Fosfatasa alcalina (del inglés "alkaline phosphatase")
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATM	Área transversal mínima
BCR	Receptor de células B (del inglés "B cells receptor")
Bet v	Componente molecular del polen de abedul (<i>Betula verrucosa</i>)
BLIMP	Proteína inductora de la maduración de los linfocitos B (del inglés "B-lymphocyte-induced maturation protein")
Breg	Linfocitos B reguladores
BSSPA	Biobanco del Sistema de Sanitario Público de Andalucía
Can f	Componente molecular del epitelio del perro (<i>Canis familiaris</i>)
CD	Células dendríticas
Cε	Dominio constante de la cadena ε
CFSE	5, 6-carboxifluoresceína diacetato N-succinimidylester
CPA	Células presentadoras de antígenos
CPH	Complejo principal de histocompatibilidad
CPI	Células plasmáticas inflamatorias
CPVL	Células plasmáticas de vida larga
CTLA	Antígeno citotóxico de linfocitos T (del inglés "cytotoxic T-lymphocyte antigen")
DEPC	Dietilpirocarbonato
Der p	Componente molecular del ácaro del polvo doméstico (<i>Dermatophagoides pteronissinus</i>)
DILI	Daño hepático inducido por medicamentos (del inglés "drug-induced liver injury")

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

DRESS	Erupción eosinofílica con sintomatología sistémica (del inglés “drug rash with eosinophilia and systemic symptoms”)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Ácaro del polvo doméstico (<i>Dermatophagoides pteronissinus</i>)
EAACI	Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica (del inglés “European Academy of Allergy and Clinical Immunology”)
ECP	Proteína catiónica del eosinófilo (del inglés “eosinophil cationic protein”)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (del inglés “ethylenediaminetetraacetic acid”)
Fab	Fragmento de unión a antígeno (del inglés “fragment antigen binding”)
Fc	Fragmento cristalizable
FcεRI	Receptor de la fracción cristalizable de cadenas pesadas ε de alta afinidad
FcεRII	Receptor de la fracción cristalizable de cadenas pesadas ε de baja afinidad
Fel d	Componente molecular del epitelio del gato doméstico (<i>Felis domesticus</i>)
FEV	Volumen expiratorio forzado (del inglés “forced expiratory volume”)
fMLP	N-formil-Met-Leu-Phe
FOXP3	Gen que codifica al factor de transcripción 3 de la familia “forkhead box) de las células T reguladoras (del inglés “forkhead box protein 3”)
FSC	Detector de dispersión frontal (del inglés “forward scatter”)
GATA3	Gen que codifica a la proteína 3 de unión a la secuencia GATA
GITR	Receptor del gen del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (del inglés “glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor-related gene”)

Abreviaturas

GM-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (del inglés "Granulocyte macrophage colony-stimulating factor")
HLA	Antígeno leucocitario humano (del inglés "human leukocyte antigen")
HRUM	Hospital Regional Universitario de Málaga
HSA	Albúmina sérica humana (del inglés "human serum albumin")
IBIMA	Instituto de Investigación Biomédica de Málaga
ICAM	Molécula de adhesión intercelular (del inglés "intercelular adhesión molecule")
ICOS	Coestimulador inducible (del inglés "inducible costimulator")
IE	Índice de estimulación
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IgEe	IgE específica
IgEt	IgE total
IgG4	Inmunoglobulina G-4
IgG4e	IgG4 específica
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleuquina
IP	Índice de proliferación
IRF	Factor regulador del interferón (del inglés "interferon regulator factor")
ISAAC	Estudio Internacional sobre Asma y Alergias en la Infancia (del inglés "International Study on Asthma and Allergies in Childhood")
iTreg	Células T reguladoras inducidas (del inglés "induced T regulatory cells")
IT	Inmunoterapia
ITSC	Inmunoterapia subcutánea

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

ITSC-DP	Inmunoterapia subcutánea específica frente a DP
kDa	kiloDalton
K_d	Constante de disociación
kU/L	Kilounidades por litro
LAG	Gen de activación de linfocitos (del inglés “lymphocyte activation gene”)
LT	Leucotrieno
MBP	Proteína básica del eosinófilo (del inglés “major basic protein”)
M.E.	Microscopía electrónica
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos (del inglés “macrophage inflammatory protein”)
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica (del inglés “National Center for Biotechnology Information”)
nDer p	Componente molecular del ácaro del polvo doméstico de origen natural (del inglés “natural <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> ”)
NK	Célula citocida natural (del inglés “natural killer”)
NR	Pacientes no respondedores a la inmunoterapia
NT	Pacientes no tratados
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAF	Factor activador de plaquetas (del inglés “platelet activating factor”)
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica (del inglés “peripheral blood mononuclear cells”)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “polymerase chain reaction”)
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés “phosphate saline buffer”)
PD	Molécula de muerte programada (del inglés “programmed death”)
PG	Prostaglandina
PHA	Fitohemaglutinina (del inglés “phycohemagglutinin”)
PMU	Puntuación de la medicación utilizada

Abreviaturas

<i>PRDM1</i>	Gen con dominio de regulación positiva 1 (del inglés “positive-regulatory-domain containing”)
PSR	Puntuación de síntomas de la rinoconjuntivitis
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (del inglés “quantitative polymerase chain reaction”)
RA	Rinitis alérgica
RAL	Rinitis alérgica local
RcT	Receptor de células T
RDC	Regiones determinantes de complementariedad
RI	Rango intercuartílico
RNA	Rinitis no alérgica
<i>RORγt</i>	Gen del factor de transcripción del receptor gamma t relacionado con el gen <i>RAR</i> (del inglés “RAR-related orphan receptor gamma t”)
rpm	Revoluciones por minuto
RP	Pacientes respondedores a la inmunoterapia
RT	Reversotranscripción
SEAIC	Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica
SI	Sistema inmune
SSC	Detector de dispersión lateral (del inglés “side scatter”)
TAB	Test de activación de basófilos
<i>T-BET</i>	Gen del factor de transcripción específico de células T (del inglés “T-cell specific T box transcription factor”)
Tc3	Células T colaboradoras tipo 3
TCR	Receptor de células T (del inglés “T-cell receptor”)
Tef	Células T efectoras
TGF	Factor de crecimiento transformante (del inglés “transform growth factor”)
Th	Células T colaboradoras (del inglés “helper T cells”)
Tm	Temperatura de fusión (del inglés “melting temperature”)
TNF	Factor de necrosis tumoral (del inglés “tumor necrosis factor”)

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

TPN	Test de provocación nasal
Tr1	Células T reguladoras tipo 1
Treg	Células T reguladoras
UGC	Unidad de gestión clínica
UI	Unidad internacional
UV	Ultravioleta
V_H	Dominio variable de la cadena pesada (del inglés “variable heavy”)
WAO	Organización Mundial de Alergia (del inglés “World Allergy Organization”)

Índice de tablas

Tabla 1. Calendario de la administración de la inmunoterapia.

Tabla 2. Batería de alérgenos empleados para la prueba cutánea.

Tabla 3. Tabla resumen de las subpoblaciones celulares analizadas en los estudios fenotípicos.

Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de los genes estudiados.

Tabla 5. Tabla resumen de las subpoblaciones celulares analizadas en los estudios funcionales.

Tabla 6. Resultados clínicos durante el seguimiento de los pacientes del estudio.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Índice de figuras

Figura 1. Representación del cambio de isotipo a IgE.

Figura 2. Representación de reacciones alérgicas tipo II, mediadas por anticuerpos citolíticos o citotóxicos.

Figura 3. Representación de las reacciones alérgicas tipo III, mediadas por inmunocomplejos.

Figura 4. Representación de las reacciones de hipersensibilidad tardía o tipo IV, mediadas por células T.

Figura 5. Esquema de la estructura general de la IgE.

Figura 6. Datos de prevalencia de la rinitis alérgica según los datos del estudio ISAAC (1998).

Figura 7. Representación fase precoz de la respuesta alérgica nasal.

Figura 8. Representación fase tardía de la respuesta alérgica nasal.

Figura 9. Secuencia de presentación del antígeno a los linfocitos T vírgenes y su diferenciación en los diferentes subfenotipos de células Th.

Figura 10. Subclases de células T reguladoras y su origen.

Figura 11. Secuencia de diferenciación celular de los linfocitos B.

Figura 12. Imagen del polen de ciprés (izquierda) y olivo (derecha) tomada con microscopía electrónica.

Figura 13. Imagen de *Dermatophagoides pteronissinus* tomada con microscopía electrónica.

Figura 14. Imagen de una prueba cutánea.

Figura 15. Mecanismo de acción de la inmunoterapia específica del alérgeno sobre la respuesta inmune.

Figura 16. Esquema de la separación celular de las PBMC mediante centrifugación en gradiente de densidad.

Figura 17. Imagen del equipamiento UniCAP 100.

Figura 18. Representación del proceso de degranulación del basófilo.

Figura 19. Análisis del test de activación de basófilos mediante citometría de flujo.

Figura 20. Imagen del equipo de citometría de flujo FACS Canto II.

Figura 21. Esquema del proceso de extracción de ARN total a partir de PBMC.

Figura 22. Imagen de un gel de agarosa para comprobar la amplificación específica en la PCR.

Figura 23. Imagen del imán utilizado para la separación celular inmunomagnética.

Figura 24. Fundamento del ensayo de proliferación por dilución del CFSE.

Figura 25. Niveles de IgEt en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

Figura 26. Niveles de IgEe (en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

Figura 27. Niveles de IgG4 (en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

Figura 28. Cociente IgEe/IgG4 en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

Figura 29. Porcentaje de células secretoras de IgG4 (A) y comparativa entre el porcentaje de células secretoras de IgG4t y los niveles séricos de IgG4e (negro) (B).

Figura 30. Reactividad de los basófilos en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

Figura 31. Estrategia de selección de las subpoblaciones Th1, Th2, Th9, Th17 y Treg mediante citometría de flujo.

Figura 32. Subpoblaciones celulares en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

Figura 33. Niveles de expresión de los factores de transcripción específicos en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

Figura 34. Producción de citoquinas en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

Figura 35. Estrategia de selección de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B mediante citometría de flujo.

Figura 36. Porcentaje de subpoblaciones celulares de linfocitos B en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

Figura 37. Porcentaje de plasmablastos y células plasmáticas en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

Figura 38. Porcentaje de células plasmáticas de vida larga y células plasmáticas inflamatorias en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

Figura 39. Porcentaje de células secretoras de IgG4, células plasmáticas y células plasmáticas inflamatorias en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

Figura 40. Porcentaje de células Breg en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

Figura 41. Porcentaje de linfocitos Th1, Th2 y Th9 en diferentes combinaciones de co-cultivos en pacientes respondedores (RP) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

Figura 42. Porcentaje de células T CD4⁺ productoras de IL-10, IL-4 e IL-9 en diferentes combinaciones de co-cultivos en pacientes respondedores (RP) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

Figura 43. Proliferación celular de linfocitos Th1, Th2 y Th9 en diferentes combinaciones de co-cultivos en pacientes respondedores (RP) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

Figura 44. Inhibición de la proliferación de linfocitos Th1 (A), Th2 (B) y Th9 (C) en diferentes combinaciones de co-cultivos tratados con α -IL-10, α -TGF- β o una combinación de ambos en pacientes respondedores (RP) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

I. Introducción



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Enfermedades alérgicas

1.1. Definición

La alergia (del griego αλλος –‘otro’–, y εργία –‘trabajo’--; compuesto αλλεργία, «reacción extraña») se define como una reacción anormal y exagerada del sistema inmunitario ante una sustancia extraña al organismo, no patógena, a la que se conoce con el nombre de alérgeno.

El alérgeno es un compuesto bien tolerado por la mayoría de la población general pero que en las personas sensibilizadas o alérgicas es capaz de desencadenar una reacción inmune inapropiada, excesiva y patológica: la alergia, que es una forma de hipersensibilidad.

Las reacciones alérgicas se producen con mayor frecuencia frente a alimentos, aeroalérgenos, fármacos y veneno de himenópteros, y se clasifican de acuerdo con la nomenclatura de la Organización Internacional de Alergia (WAO) en: asma alérgico, rinitis alérgica (RA), rinoconjuntivitis alérgica, dermatitis de contacto, urticaria alérgica, alergia alimentaria, alergia a fármacos, alergia a picadura de insectos y reacciones anafilácticas (1).

1.2. Mecanismos generales de las enfermedades alérgicas

La función principal del SI es la de proteger al organismo frente a sustancias extrañas mediante mecanismos efectores de defensa. Sin embargo, hay casos en los que se originan respuestas alteradas que producen daños en los tejidos y que actúan mediante la formación de anticuerpos específicos, linfocitos sensibilizados o ambos (2) frente a sustancias que en otros individuos son inocuas.

En función del mecanismo implicado Gell y Coombs (3) clasificaron las reacciones de hipersensibilidad en cuatro tipos fundamentales:

a) Reacciones tipo I o de hipersensibilidad inmediata, mediadas por IgE

Están mediadas por anticuerpos IgE específicos (IgEe) unidos a receptores de alta afinidad (FcεRI) en la superficie de mastocitos tisulares y basófilos circulantes. Este tipo de reacciones alérgicas constan de dos fases:

I. Fase de sensibilización

La entrada en el organismo de un alérgeno pone en marcha el proceso de sensibilización, que comienza cuando células presentadoras de antígenos (CPA), como las células dendríticas (CD), capturan los antígenos, los procesan y los transportan a los ganglios linfáticos, donde son presentados como péptidos a los linfocitos T cooperadores (Figura 1).

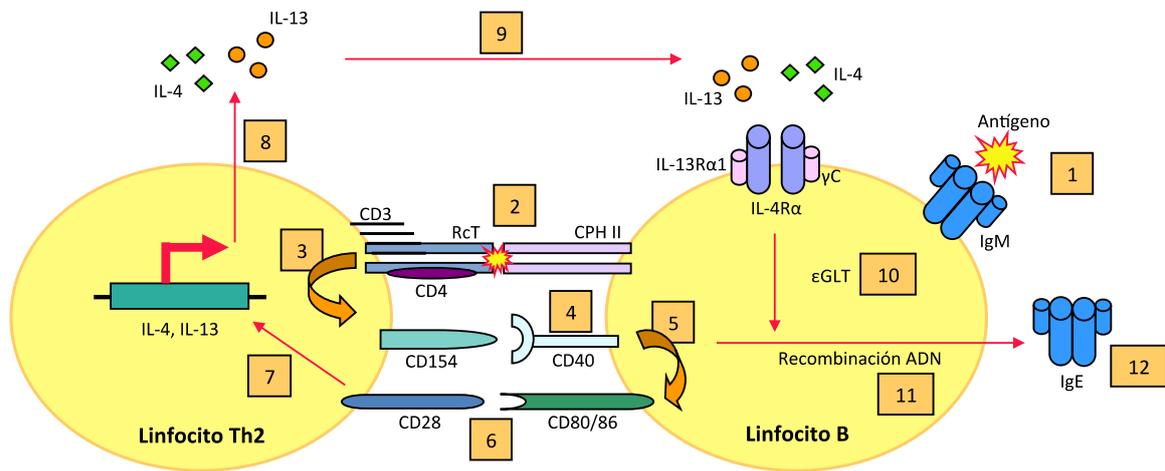


Figura 1: Cambio de isotipo a IgE.

Una célula B que expresa IgM específica para el antígeno se une a éste por medio de las Igs de su superficie celular (1), lo procesa y lo presenta a una célula T tipo Th2 específica de ese antígeno (2). La formación del complejo tri-molecular receptor de células T (TCR, del inglés "T-cell receptor)-antígeno-complejo principal de histocompatibilidad (CPH) de clase II induce una expresión rápida en los linfocitos T de CD154 (3), que es el ligando del receptor CD40 que se expresa constitutivamente sobre los linfocitos B (4). La interacción entre las células T y B mediadas por la vía CD40/CD154 (4) se amplifica por interacciones entre moléculas coestimuladoras, particularmente la pareja ligando/receptor CD28/CD80-CD86 (5). La unión de CD40 regula la expresión de CD80-CD86 sobre las células B (5). CD80-CD86 se une a CD28 (6) e induce la transcripción (7) y secreción (8) de IL-4 y/o IL-13, que se unirán a sus receptores heterodiméricos en los linfocitos B (9). En un mismo paso, la célula B recibe las dos señales necesarias para el cambio de isotipo a IgE: IL-4 dispara la transcripción de la cadena pesada ε (10) y la unión de CD40 con su ligando activa la recombinación de ADN para la región ε (11), provocando el cambio de isotipo a IgE y la secreción de anticuerpos IgE (12). Modificado de Vercelli D, Immunobiology of IgE. En: Middleton's Allergy, 7th Ed, 2009 (5).

I. Introducción

Si dicha presentación se produce en presencia de las señales secundarias (moléculas coestimuladoras) y terciarias (citoquinas polarizadoras) adecuadas, estos linfocitos se diferencian en la subpoblación de células efectoras Th2, que estimulan a los linfocitos B para la síntesis de IgE frente al antígeno. Para que estas células, que en principio producen IgM, cambien el isotipo del anticuerpo producido, son necesarias dos señales a través de una compleja serie de interacciones con el antígeno y con las células T específicas (4).

Una de las señales es dependiente de citoquinas producidas por linfocitos Th2 (principalmente IL-4 y también IL-13) y tiene como resultado la activación de la transcripción de la cadena pesada ϵ de la IgE. La otra señal es dependiente de CD40, que es un receptor que se expresa de forma constitutiva sobre los linfocitos B y que induce la recombinación del ADN para la región de la cadena pesada ϵ (6) y la expresión de IgE. De este modo, se genera un gran número de anticuerpos IgE que pasan a la circulación sanguínea.

Estos anticuerpos IgE se unen de forma reversible por su región Fc (fracción cristalizante) a receptores Fc ϵ RI en mastocitos y basófilos (7). De este modo, dichas células quedan sensibilizadas frente al antígeno. La afinidad de Fc ϵ RI por la IgE es muy alta ($[K_d] = 1 \times 10^{-10}$ M), y esta unión es mucho más estable que la de cualquier otro receptor con su ligando. Aunque la concentración sérica normal de IgE es baja (inferior a 5×10^{-10} M), comparada con la de otros isotipos de Ig, es lo suficientemente alta como para permitir que los receptores Fc ϵ RI estén ocupados por moléculas de IgE y los mastocitos y basófilos de todos los individuos estén recubiertos de IgE.

II. *Desarrollo de la respuesta alérgica inmediata*

En un individuo sensibilizado frente a un determinado alérgeno, una gran proporción de la IgE unida a los receptores Fc ϵ RI de la superficie de mastocitos y basófilos es específica frente al mismo. Ante una nueva exposición, el alérgeno interacciona con la región Fab (fracción de unión al antígeno, del inglés "Fraction antigen binding") de dos o más moléculas de IgE adyacentes

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

de la superficie celular de mastocitos y basófilos, fenómeno que se denomina puenteo y que desencadena la activación de estas células.

La activación de los mastocitos y los basófilos provoca cambios en su membrana celular y desencadena una serie de reacciones en cascada que finaliza con la secreción de un gran número de mediadores preformados almacenados en los gránulos celulares (histamina, triptasa, heparina o factores quimiotácticos) mediante un proceso regulado de exocitosis, y la síntesis y secreción de mediadores lipídicos (leucotrienos y prostaglandinas) (8) y de citoquinas que pueden contribuir a la inflamación alérgica (TNF, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-3, GM-CSF). Algunas de estas citoquinas potencian la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria, como la selectina E y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, lo que facilita la atracción y extravasación de leucocitos inflamatorios hacia los tejidos.

Todos los mediadores liberados son los responsables de las manifestaciones clínicas características de estas reacciones y sus principales efectos son la vasodilatación y la contracción del músculo liso, que ocurren con gran rapidez tras la exposición al antígeno (reacción inmediata), y una reacción retardada, que produce principalmente inflamación.

Los síntomas de las reacciones inmediatas pueden manifestarse en la piel (urticaria), vías respiratorias (rinitis, asma bronquial) o tubo digestivo (vómitos, dolor abdominal y diarrea), o ser generalizados y afectar a más de un órgano, como sucede en las reacciones anafilácticas (prurito, urticaria, hipotensión, angioedema y broncoespasmo), pudiendo causar incluso la muerte del paciente.

b) Reacciones de tipo II, mediadas por anticuerpos citolíticos o citotóxicos

Se caracterizan por la presencia de anticuerpos IgG e IgM (y en menor medida IgA) frente a antígenos de la superficie celular de eritrocitos, neutrófilos, plaquetas y células epiteliales de glándulas y mucosas o frente a

I. Introducción

antígenos tisulares. En este tipo de reacciones los antígenos pueden ser autoantígenos naturales, que forman parte de la superficie de las células del paciente, o antígenos externos que se han unido a la célula modificando su superficie (alérgenos, haptenos o moléculas procedentes de una infección por un agente patógeno). Los anticuerpos circulantes se unen de forma específica a los antígenos de superficie celular y guían a los elementos no específicos del sistema inmune para conseguir la eliminación de estas células por lisis celular (mediada o no por el complemento) o por opsonización y fagocitosis (Figura 2). Las manifestaciones clínicas más habituales son la anemia hemolítica inmune, la trombocitopenia o la granulocitopenia.

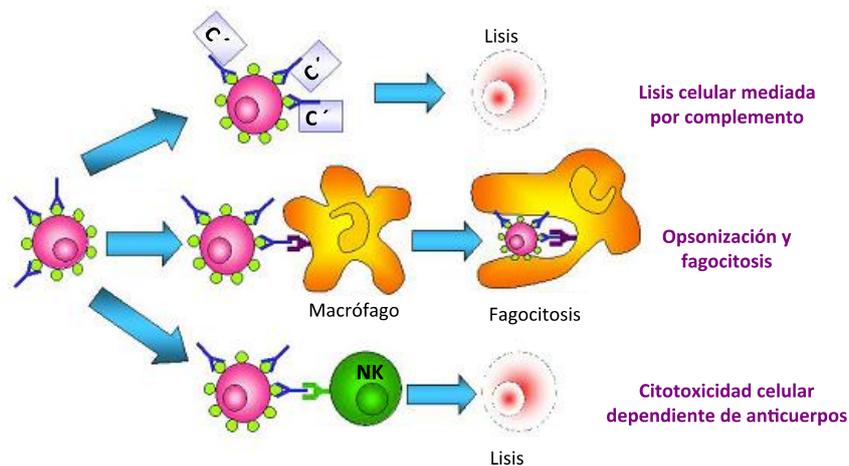


Figura 2. Reacciones Tipo II, mediadas por anticuerpos citolíticos o citotóxicos.

c) Reacciones tipo III, mediadas por inmunocomplejos

En estas reacciones participan anticuerpos IgG e IgM, la vía del complemento y los neutrófilos como respuesta a ciertos antígenos, provocando un daño inmunológico. Se caracterizan por la formación de inmunocomplejos entre los antígenos y anticuerpos solubles (IgM o IgG), que generan inmunoprecipitados que se depositan en tejidos como el endotelio de pequeños vasos sanguíneos o la membrana basal glomerular.

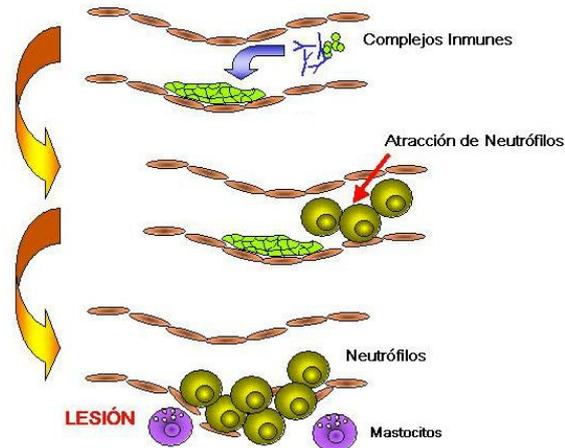


Figura 3. Reacciones Tipo III, mediadas por inmunocomplejos.

La activación del complemento provoca la liberación de moléculas quimiotácticas que desencadenan una compleja serie de respuestas inflamatorias que se agravan por una fagocitosis fallida y la liberación de especies reactivas de oxígeno (Figura 3), como ocurre en enfermedades como el lupus eritematoso sistémico o la glomerulonefritis postestreptocócica.

d) Reacciones tipo IV o de hipersensibilidad tardía, mediadas por células T

Estas reacciones no están mediadas por anticuerpos, sino que el antígeno es reconocido e interacciona directamente con las células T que actúan como células efectoras. La liberación de quimioquinas tras la producción de un daño en el tejido provoca, en un segundo contacto con el antígeno, la captura y extravasación al tejido afectado de linfocitos T específicos a los que ya se les había presentado el antígeno en un contacto anterior (sensibilización). Una vez en el tejido, estas células liberan mediadores proinflamatorios (citotoxinas entre otros) y otras citoquinas específicas que atraen hacia el tejido monocitos, macrófagos y otras células T que son las encargadas de mediar la respuesta inflamatoria (Figura 4).

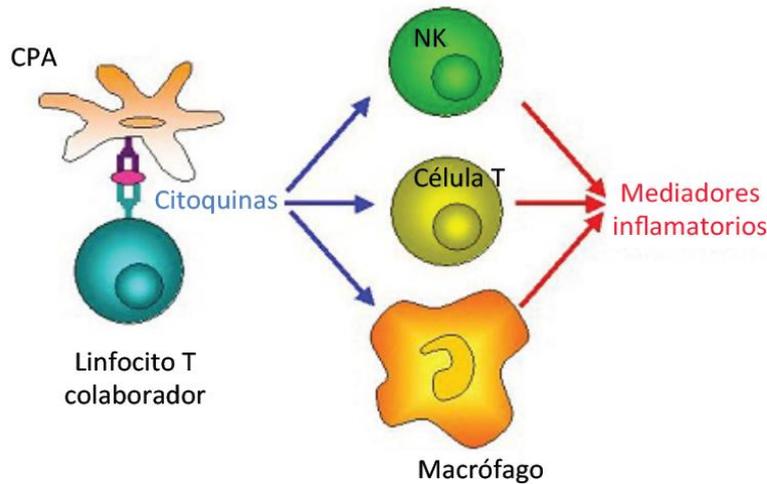


Figura 4. Reacciones de hipersensibilidad tardía o Tipo IV, mediadas por células T.

El espectro clínico de las reacciones Tipo IV es amplio, afectando principalmente a la piel, y comprende desde manifestaciones leves como el exantema hasta cuadros clínicos graves como el síndrome de Stevens-Johnson, la necrolisis epidérmica tóxica y el exantema fijo medicamentoso. Además otras reacciones como el DILI (del inglés “drug-induced liver injury”) pueden afectar exclusivamente al hígado (9), o ser sistémicas como el DRESS (10) (del inglés “drug rash with eosinophilia and systemic symptoms”). Los fármacos son las principales causas de este tipo de reacciones.

De estos cuatro tipos de reacciones las más frecuentes son las mediadas por IgE (Tipo I), objeto de esta tesis, o por células T (Tipo IV).

1.3. Conceptos inmunológicos relacionados con las reacciones alérgicas inmediatas o de tipo I: la IgE

La IgE fue descubierta en 1967 por Ishizaka y Johanson, quienes, trabajando por separado, describieron casi simultáneamente este nuevo isotipo de Ig (11). Desde su descubrimiento, se ha demostrado que la IgE interviene tanto en las reacciones de hipersensibilidad inmediata como en la respuesta inmunológica frente a infecciones parasitarias (12-14).

1.3.1. Estructura general

La estructura general de la IgE es similar a la de las otras Igs, con dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H) unidas covalentemente por puentes disulfuro. El isotipo IgE se caracteriza por la secuencia proteica de sus cadenas pesadas tipo ϵ , que contienen un dominio variable (V_H) y cuatro dominios constantes ($C\epsilon 1-4$) (15), siendo el dominio $C\epsilon 2$ de la IgE el que reemplaza a la región bisagra que aparece en otros isotipos (7) y el dominio $C\epsilon 3$ el punto de unión a los receptores de superficie celular (Figura 5). El peso molecular de la molécula completa es de 118-196 kDa (16).

Como todas las Igs, la IgE presenta dos regiones funcionales: el Fab y el fragmento cristalizante (Fc). La región Fab es la zona variable formada por el extremo N-terminal de las cadenas pesadas y ligeras, y en ella reside la especificidad de la Ig y la capacidad de reconocer y unirse al antígeno. La Fc es una región constante compuesta por la porción C-terminal de las cadenas pesadas y es la mediadora de las funciones efectoras de la Ig a través de la unión con sus receptores específicos.

Los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas interactúan entre sí para formar una unidad globular que contiene el sitio de unión con el antígeno. Dentro de los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas existen ciertos segmentos con secuencias muy variables que se denominan regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (RDC). Las RDC están compuestas por unos diez aminoácidos y forman una superficie de contacto complementaria a la estructura tridimensional del antígeno al que se une la Ig. El resto del dominio no está involucrado directamente en el reconocimiento del antígeno, pero actúa como soporte. Los anticuerpos IgE se unen de forma reversible por su región Fc a los receptores $Fc\epsilon R$ (7). Existen dos tipos de receptores: los receptores $Fc\epsilon RI$, que se expresan en la superficie de mastocitos, basófilos, eosinófilos, CD y células de Langerhans, y los receptores $Fc\epsilon RII$ o de baja afinidad, que se expresan en la superficie de monocitos y células B.

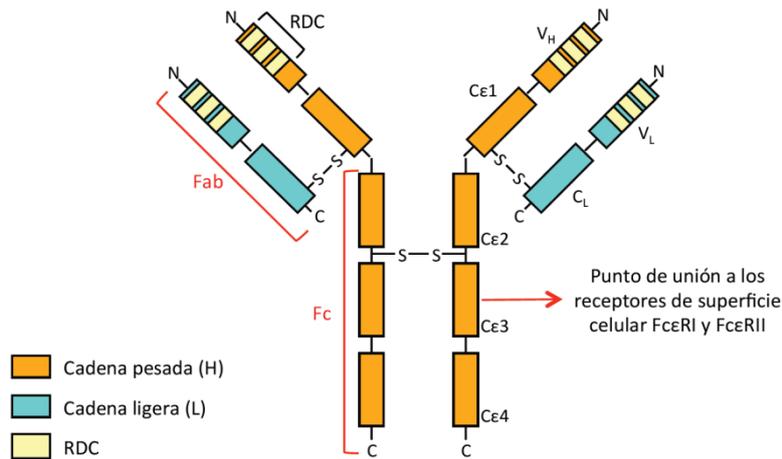


Figura 5. Esquema de la estructura general de la IgE.

1.3.2. Síntesis y concentración sérica

Las moléculas de IgE son producidas principalmente por las células plasmáticas en tejidos linfoides asociados a mucosas (17). La mayoría de la IgE producida se une a los receptores FcεRI expresados en la superficie de mastocitos y basófilos (17) y el resto se une a los receptores FcεRII o circula libre por el torrente sanguíneo. La vida media de la IgE en suero es de sólo 3 días frente a los 20 días de la IgG, pero aumenta cuando la IgE es retenida en los tejidos unida a receptores de la superficie celular (18).

La concentración sérica de la IgE es la más baja de todas las Igs. En individuos no alérgicos, los niveles séricos de IgE total (IgEt) son entre 10.000 y 50.000 veces inferiores a los de IgG, e incluso en individuos atópicos con valores muy altos de IgE la concentración sigue siendo unas 1.000 veces inferior a la de IgG (17), por lo que son necesarias técnicas de alta sensibilidad para su detección (19). Una característica importante de la IgE es que, a pesar de su baja concentración, su acción se ve amplificada por numerosos factores entre los que se encuentra la actividad de los receptores celulares a los que se une (7).

En adultos sanos la concentración de IgEt en plasma es inferior a 20 UI/mL y la de IgEe no supera las 0,35 UI/mL (20), pero estos valores varían con

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

la edad. Los niveles séricos de IgE no son detectables al nacer porque esta Ig no tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria, pero su concentración sérica aumenta progresivamente hasta alcanzar un pico máximo a los 10-15 años, que después disminuye hasta mantenerse constante durante toda la vida adulta.

En individuos atópicos la concentración de IgE circulante puede superar unas 10-50 veces los valores normales, y en personas que desarrollan una reacción alérgica tiene lugar una producción amplificada de IgE frente al antígeno que induce la reacción, pudiendo alcanzar unos niveles de IgE 1.000 veces superiores a los de individuos no alérgicos (21).

En algunas enfermedades de tipo infeccioso e inmunológico podemos observar un aumento de los niveles de IgE sin que se muestren signos de enfermedad alérgica. Este es el caso de las enfermedades parasitarias causadas por helmintos (22), infecciones víricas como la mononucleosis (23) y las producidas por los citomegalovirus (24), determinadas inmunodeficiencias primarias así como en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Además, en trasplantes de médula ósea se ha observado la aparición de un pico de IgE probablemente como consecuencia de una alteración en el control de su producción (25).

1.3.3. Síntomas clínicos de las reacciones mediadas por IgE

Los síntomas de las reacciones inmediatas pueden ser sistémicos, como en las reacciones anafilácticas, o localizarse en la piel (urticaria), tubo digestivo (vómitos, dolor abdominal y diarrea) o vías respiratorias (rinitis, asma bronquial).

Las reacciones anafilácticas se definen como reacciones de hipersensibilidad sistémica generalizada que supone un peligro para la vida del paciente (1). Los síntomas pueden incluir hipotensión, colapso e inconsciencia y, en ocasiones, pueden producir la muerte. También pueden producirse

I. Introducción

síntomas como enrojecimiento generalizado de la piel, urticaria o angioedema, entre otros.

La urticaria alérgica es una reacción en la piel mediada por IgE caracterizada por lesiones cutáneas edematosas, generalmente acompañada de prurito. Se puede producir localmente tras un contacto directo con el alérgeno (26-27), en cuyo caso se denomina urticaria alérgica de contacto, o mediante la ingesta de fármacos como los antibióticos betalactámicos (28), de ciertos alimentos (29) o por picadura de insectos (30).

Las reacciones localizadas en el tubo digestivo suelen ser producidas por alergias alimentarias. Al ingerir el alérgeno, se produce una respuesta mediada principalmente por IgE, o en menor frecuencia mediada por células de tipo Th2 (31-34).

Dentro de las reacciones alérgicas originadas en las vías respiratorias, la RA es la más frecuente. La rinitis es una inflamación de la mucosa nasal caracterizada por síntomas nasales, incluidos rinorrea anterior o posterior, estornudos, bloqueo y/o prurito nasal (35). Estos síntomas se producen durante dos o más días consecutivos durante más de una hora la mayoría de los días (36).

Esta última manifestación clínica de las reacciones mediadas por IgE será el objeto de estudio de esta tesis doctoral, por lo que se va a desarrollar en detalle a continuación

2. Rinitis

2.1. Clasificación de la rinitis

Existen muchas clasificaciones de rinitis, como por ejemplo la de la Academia Europea de Alergia en Inmunología Clínica (EAACI) de 1994 (36). Posteriormente, se propuso una nueva clasificación etiológica de la rinitis, más novedosa y en la que participaron varios expertos internacionales, la OMS (Organización Mundial de la Salud), la AAAAI (del inglés "The American

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

Academy of Allergy Asthma & Immunology”), la EAACI, Interasma y la SEAIC (Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica) en la que se diferenció entre rinitis no alérgica (RNA) y RA (35).

2.1.1. Rinitis no alérgica

La RNA es un término que engloba a un grupo muy heterogéneo que puede ser clasificado a su vez en RNA con factor desencadenante conocido y RNA con factor desencadenante desconocido (37), siendo las más frecuentes el síndrome de RNA con eosinofilia y la rinitis idiopática, respectivamente (38).

2.1.2. Rinitis alérgica

Tradicionalmente la RA se ha clasificado en función del periodo de exposición al alérgeno en estacional, perenne y ocupacional. La RA estacional se debe a la exposición a una amplia variedad de alérgenos presentes en la atmósfera durante una estación concreta, como ocurre con la mayoría de los pólenes y algunos hongos. La RA perenne está causada por alérgenos presentes en el ambiente, fundamentalmente doméstico, durante todo el año. Generalmente son alérgenos “de interior”, como los ácaros del polvo, epitelios de animales, hongos y cucarachas, entre otros. En cambio, si la exposición al alérgeno tiene lugar en el medio laboral, se denomina RA ocupacional.

Sin embargo, esta clasificación presenta algunos inconvenientes (39) ya que en algunas zonas geográficas los llamados alérgenos “estacionales” están presentes durante la mayor parte del año, como ocurre por ejemplo con los hongos en los climas tropicales y el polen de *Parietaria* en el área mediterránea. Por otra parte, los “alérgenos perennes” no siempre lo están y el paciente puede exponerse a ellos de forma intermitente o incluso su concentración puede estar sometida a variaciones estacionales, como ocurre con las poblaciones de ácaros. Así mismo, es cada vez más frecuente que los sujetos estén polisensibilizados, y por lo tanto, que presenten síntomas durante largos periodos, no pudiendo diferenciarse claramente la rinitis perenne de la estacional (40).

Además, estudios recientes (41-44) han demostrado la existencia de un subgrupo de pacientes con clínica de rinitis que presenta una forma localizada de alergia en la mucosa nasal. Estos pacientes se caracterizan por la ausencia de atopia sistémica (*prick* test e IgEe sérica negativos) pero presentan un infiltrado inflamatorio nasal muy similar al de la RA. Esta nueva entidad clínica de rinitis ha sido denominada rinitis alérgica local (RAL) (45) y ha motivado finalmente que se proponga una nueva clasificación etiológica de la rinitis, incluyendo este subfenotipo de la RA (46), ya que estos pacientes eran previamente diagnosticados de rinitis idiopática.

2.2. Epidemiología de la rinitis alérgica

La RA representa un problema global de salud, con un al 20-30% de la población europea afectada (47). En este sentido, y haciendo una estimación conservadora, podemos afirmar que la RA afecta a 500 millones de sujetos en todo el mundo (35). En algunos países estas cifras son incluso más altas, involucrando entorno al 40% de la población pediátrica (48-49) y al 50% de los adolescentes (50), y situándose entre los primeros 10 motivos de consulta de los médicos de atención primaria en Estados Unidos (51). En este país se calcula unos 58 millones de personas presentan RA (38).

Los resultados de uno de los estudios epidemiológicos más ambiciosos sobre la prevalencia de asma y alergia durante la infancia (*ISAAC, International Study on Asthma and Allergies in Childhood*) (52), han mostrado una correlación significativa entre la prevalencia de asma y rinitis. Así, los países con una prevalencia muy alta de asma (>30%) como Australia, nueva Zelanda y Reino Unido tenían una elevada prevalencia de rinitis (15-20%); y los países con muy baja prevalencia de asma (<5%) como Indonesia, Albania, Rumania, Georgia y Grecia, tenían baja prevalencia de rinitis (Figura 6).

Con respecto a la prevalencia en España, la sintomatología nasal fue el motivo de consulta del 55,5% de los pacientes atendidos en los servicios de alergia, confirmándose el diagnóstico de RA en un 63,7% de los casos (53).

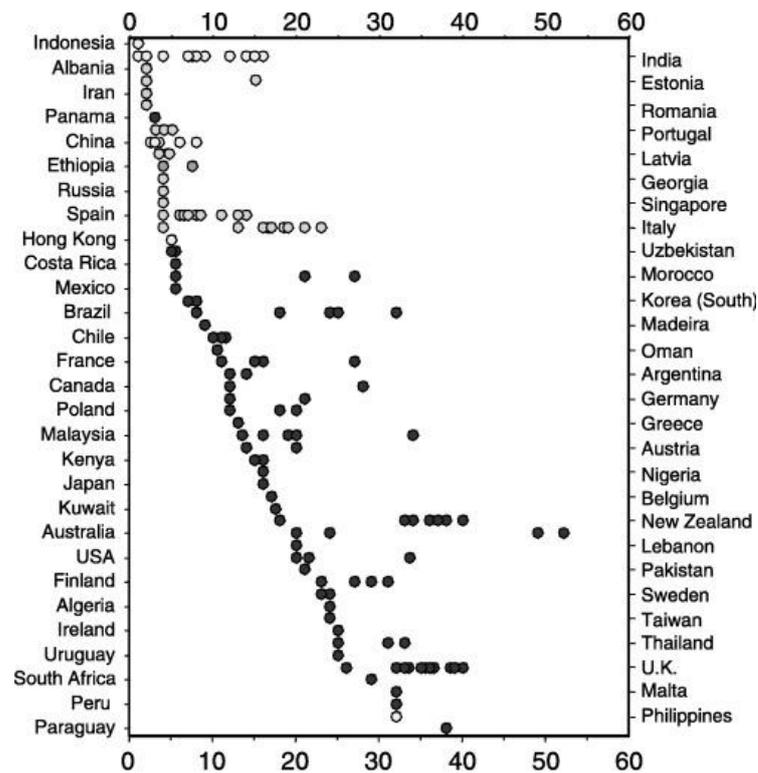


Figura 6. Datos de prevalencia de la RA según los datos del estudio ISAAC de Aher et al (1998) (52).

Uno de los hechos más significativos en el campo de la alergología ha sido la constatación del aumento de la prevalencia de las enfermedades alérgicas acaecido en las últimas décadas, constituyendo un serio problema de salud pública en la mayoría de los países industrializados (54). La RA es, sin duda, el proceso alérgico respiratorio más frecuente y, por tanto, su prevalencia ha sufrido el mismo proceso evolutivo. Así se considera de forma generalizada a la rinitis como una de las epidemias del siglo XXI, especialmente en los países occidentales.

2.3. Factores de riesgo de la rinitis alérgica

a) Genética y antecedentes familiares

El factor de riesgo más importante son los antecedentes familiares de alergia (39). Durante la última década se han identificado varios antígenos del sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA del inglés "human leukocyte antigen") que aparecen asociados con una mayor frecuencia en pacientes con RA estacional (55). Además, se han propuesto genes candidatos involucrados en

la respuesta inmune específica (sistema *HLA* y *TCR*) (56-58), en la respuesta IgE (*IL-4*, *IL-4R*, *IFN- γ* , *Fc ϵ R1B*) (57, 59) así como en el cromosoma 12q para el asma y la RA (55).

b) Factores de riesgo al comienzo de la vida y exposición a alérgenos

Varios estudios han mostrado evidencias de que la sensibilización a los alérgenos podría ocurrir en una etapa muy temprana de la vida (60). Sin embargo, los estudios epidemiológicos muestran resultados contradictorios.

De acuerdo con un estudio sueco (61), la juventud de la madre, la gestación múltiple, la prematuridad, el bajo peso al nacer, el retraso en el crecimiento y el estrés respiratorio perinatal se relacionan significativamente con una reducción del riesgo de padecer RA. En otro, los resultados reflejan una asociación entre la introducción temprana de comidas sólidas, el tabaquismo de la madre durante el primer año de vida y los niveles elevados de IgE con el desarrollo de rinitis en los primeros años de vida (49). La exposición precoz a alérgenos es conocida como un factor de riesgo para el desarrollo de la RA (62). Sin embargo, recientemente han surgido nuevas hipótesis sobre el efecto de la exposición alérgica sugiriéndose que la exposición precoz a plumas de almohadas o edredones, gatos y perros puede tener un efecto protector en algunos individuos (63-65).

c) Diferencias rurales y urbanas y modificación del estilo de vida

Diferentes estudios han demostrado que la prevalencia de atopia (definida como la positividad de pruebas cutáneas frente a aeroalérgenos habituales en el medio) y de RA es mayor en áreas urbanas que en áreas rurales (66-68). La polución, especialmente los residuos de combustión diésel, es un factor importante en el aumento del potencial alérgico de los pólenes (69-70).

d) Microbioma

Cada vez son mayores las evidencias de que la composición del microbioma gastrointestinal y de pulmón es un factor determinante en el desarrollo del asma y la alergia, siendo la hipótesis de la higiene una posible

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

explicación. De acuerdo con ella, la ausencia de una exposición temprana a agentes infecciosos, microorganismos simbióticos y parásitos incrementa la susceptibilidad frente a enfermedades alérgicas. Esto sería debido a una estimulación insuficiente de células Th1 (71), que no podrían equilibrar los efectos de las células Th2, aumentando la predisposición a las enfermedades alérgicas (72).

e) Grupos étnicos

Se han realizado pocos estudios sobre la prevalencia de la RA en diferentes grupos étnicos. En Inglaterra se observó que los sujetos nativos tenían un menor riesgo de sufrir alergia que los nacidos en Asia o en las Indias Occidentales de etnias asiática y amerindia, respectivamente (73).

f) Tabaquismo

Los resultados de un estudio transversal mostraron que el tabaquismo era más frecuente en adolescentes con RA que en los no alérgicos (74), aunque en otro estudio se obtuvo una asociación negativa entre tabaquismo y RA estacional (75). Desafortunadamente, la falta de estudios longitudinales hace difícil poder establecer con certeza si el tabaquismo es un factor que predispone a padecer alergia (76-77)

2.4. Fisiopatología de la rinitis alérgica

Los estudios de provocación nasal con alérgenos (41-42, 78-81) nos han permitido mejorar el conocimiento sobre los mecanismos inmunológicos implicados en la RA. En los pacientes se detecta una respuesta alérgica nasal en fase precoz y en fase tardía tras la exposición al alérgeno.

a) Fase temprana

Tras el contacto con el alérgeno se produce la activación de células epiteliales, demostrada por el incremento de la expresión de moléculas de adhesión (82). Esta fase alcanza su pico máximo a los 10-15 minutos, y desaparece progresivamente en unos 60 minutos. Los pacientes presentan prurito nasal, rinorrea, estornudos y ocasionalmente obstrucción nasal. Durante

I. Introducción

esta fase se produce la liberación de mediadores que incluyen histamina, triptasa, prostaglandina (PG) D2 y leucotrienos (LT) B4 y C4. La histamina se correlaciona con la aparición de estornudos y rinorrea, alcanzando su pico máximo en los primeros 2 minutos, de forma paralela a su liberación (83). Los cisteinil-LT (LTC₄, LTD₄ y LTE₄) y la PGD₂ producen un aumento de la permeabilidad vascular y de la secreción glandular. Su liberación parece ser más prolongada, induciendo obstrucción nasal (84-85).

Durante esta fase se produce hipersecreción y congestión nasal (86), estimulada directamente por agonistas α -adrenérgicos y colinérgicos (87). Se produce un exudado plasmático que contiene quininas, mediadores vasculares, albúmina, inmunoglobulinas, histamina, mediadores pro-inflamatorios y proteínas activadas del complemento.

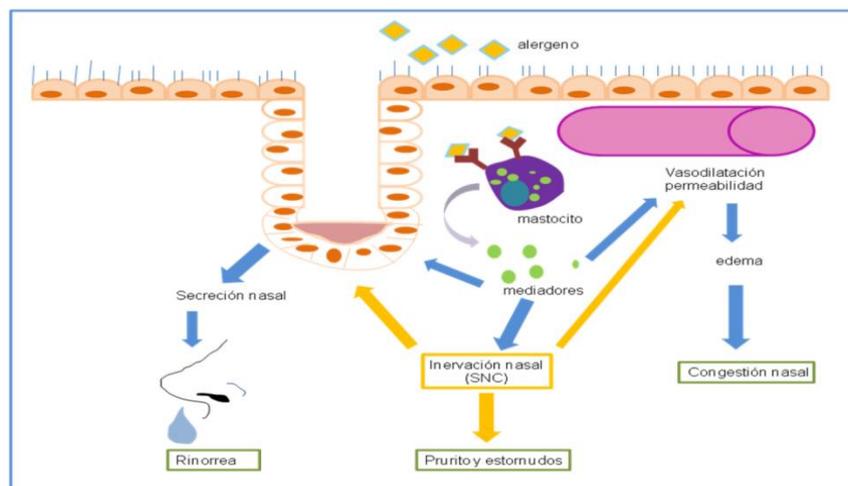


Figura 7. Fase temprana de la respuesta alérgica nasal. Tomado de Villajos (2004) (88).

Finalmente, los mastocitos y células epiteliales liberan factores quimiotácticos (citoquinas y mediadores como el LT B₄) y factor activador plaquetario (PAF, del inglés “platelet-activating factor”) que desencadenan una cascada inflamatoria (89) (Figura 7).

b) Fase tardía

Se inicia a las 3-6 horas de la exposición al alérgeno, alcanzando su pico máximo a las 6-8 horas, y remitiendo en las 12-24 horas siguientes. Los

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

pacientes manifiestan fundamentalmente síntomas de obstrucción nasal, y en menor medida rinorrea y estornudos. La fase tardía se caracteriza por un reclutamiento e infiltración de células inflamatorias en la mucosa nasal debido a la acción de citoquinas y quimioquinas liberadas durante la fase precoz. Entre las células reclutadas encontramos: eosinófilos, linfocitos T CD4⁺ activados que expresan CD25⁺ (receptor de IL-2), basófilos y neutrófilos. La acumulación de células inflamatorias en la mucosa nasal es característica de la fase tardía. Un factor clave es el aumento de expresión de moléculas de adhesión de las células endoteliales, que favorece el paso de células sanguíneas a través del endotelio vascular hacia la mucosa nasal (88).

Los eosinófilos liberan la proteína catiónica del eosinófilo (ECP, del inglés "eosinophil cationic protein") y la proteína básica principal (MBP, del inglés "major basic protein") e inducen la degranulación de otras células inflamatorias, causando la lesión de las células epiteliales (90). De forma similar al mastocito, el basófilo interactúa con el alérgeno mediante el complejo IgE/FcεRI, se activa y libera histamina. Debido a que el nivel de histamina se encuentra elevado durante la fase tardía de la respuesta alérgica, pero no los de triptasa ni PGD₂, se considera que esta liberación de mediadores se debe fundamentalmente a una activación del basófilo y no a una activación secundaria del mastocito (91) (Figura 8).

La supervivencia de las células inflamatorias en la zona de la reacción alérgica depende de los fenómenos de muerte celular que se produzcan durante la evolución de la inflamación en la vías respiratorias o por apoptosis (muerte celular programada) destinada a la eliminación de células dañadas o superfluas (88).

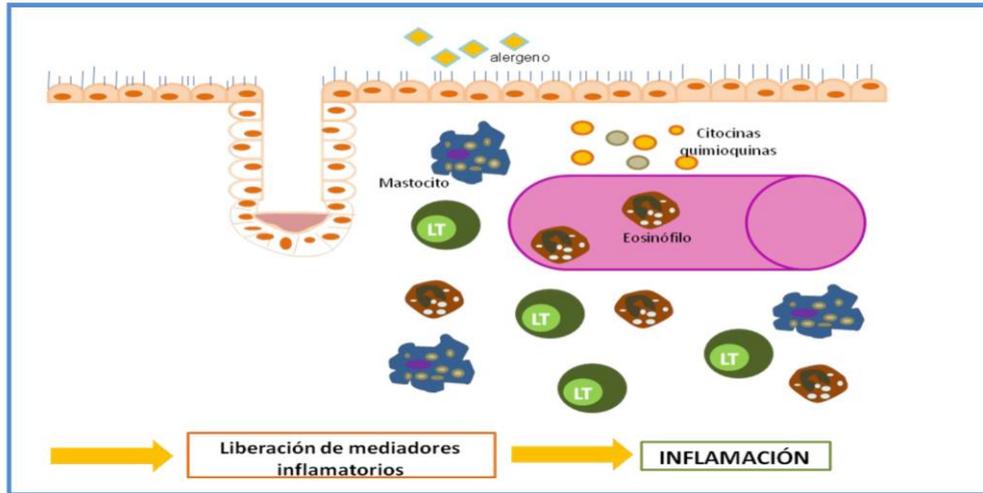


Figura 8. Fase tardía de la respuesta alérgica nasal. Tomado de Villajos (2004) (88)

2.4.1. Células implicadas en la respuesta durante la fase temprana en rinitis alérgica

En este tipo de respuesta alérgica participan células tanto del SI innato como del adaptativo. El SI innato proporciona una primera línea de defensa frente a las infecciones más comunes producidas por microorganismos, aunque algunos patógenos escapan de este control. A este sistema pertenecen células como CD, eosinófilos, células citocidas naturales (NK, del inglés “natural killer”), basófilos y mastocitos entre otras.

El SI adaptativo comienza a actuar en el momento que una CD inmadura fagocita un patógeno, lo digiere en los fagosomas y lo presenta en su superficie a otras células especializadas como los linfocitos T efectores (Tef), que se activan y comienzan a actuar frente al patógeno. A este SI pertenecen, además de los dos tipos celulares anteriores, los linfocitos T reguladores (Treg) y los B.

a) Células dendríticas

Las CD, como iniciadoras de la respuesta inmune, tienen la capacidad de dirigir el tipo de respuesta hacia efectora o tolerante, y esto depende principalmente de su estado de maduración. La activación y/o maduración de las CD consiste en una serie de eventos que producen cambios fenotípicos y funcionales que modifican su capacidad de captación, procesamiento y

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

presentación antigénica. Las CD inmaduras tienen una elevada capacidad de captación y procesamiento antigénico y ejercen funciones tolerogénicas, pudiendo actuar como inductoras de células Treg CD4⁺CD25⁺CD127⁻FoxP3⁺ (92-93); y las CD maduras con gran capacidad de presentación antigénica a los linfocitos, inducen una respuesta inmunológica que, dependiendo del estímulo, tendrá un patrón Th1, Th2, Th9 o Th17 entre otras (92).

b) Basófilos

Los basófilos representan en sangre periférica menos del 0,5% del total de los leucocitos. Son células de origen hematopoyético (CD34⁺) que, a diferencia de los mastocitos, completan su diferenciación en la médula ósea y entran en la circulación como células maduras (94). Entre los estímulos más importantes para su diferenciación intervienen varias citoquinas entre las que destaca la IL-3.

Los basófilos pueden activarse por un mecanismo inmunológico, ya que expresan en su superficie receptores FcεRI y FcεRII para la IgE (95-96), y por otros estímulos, como las anafilotoxinas (C5a y C3a), el péptido bacteriano f-met-leu-phe, el PAF, la MBP, diversas citoquinas y algunos fármacos. Estas células juegan un papel importante en la fase tardía de la reacción alérgica y potencian la síntesis de IgE, ya que liberan IL-4 e IL-13, y sus gránulos citoplasmáticos contienen histamina (probablemente el principal mediador de la fase temprana en el contacto con alérgeno) y LT (97-98).

En condiciones normales no se encuentran en los tejidos, hacia los que emigran al producirse una reacción inflamatoria (99). También se ha observado este fenómeno en los sujetos con RA, donde los basófilos se infiltran en la mucosa tras la exposición al alérgeno. Pueden detectarse en el epitelio y en la lámina propia a los 60 minutos y persisten hasta una semana (100).

c) Células Natural Killer

Las células NK son uno de los elementos principales del SI innato y presentan una potente actividad citolítica (101-102). Estas células poseen gránulos en su citoplasma que contienen moléculas citotóxicas como perforina,

granzima y anexina, que son liberadas a la zona de contacto con la célula diana cuando se produce la señal apropiada.

Las células NK tienen además la capacidad de producir citoquinas como IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-5 e IL-13 (103-104), lo que explica su participación en los mecanismos de inflamación. Pueden interactuar con las CD, que a su vez estimulan a las NK, las cuales son capaces de generar una señal co-estimuladora en linfocitos T o B (105-106), produciéndose una respuesta inmune óptima.

Las células NK se diferencian de los linfocitos T y B morfológica, fenotípica y funcionalmente. Al contrario que los linfocitos, no requieren sensibilización previa a un antígeno y fenotípicamente se caracterizan por presentar en su superficie la molécula CD56, pero no CD3.

d) Linfocitos T efectores

Las células T CD4⁺ vírgenes se diferencian en los órganos linfoides secundarios y migran hacia tejidos no linfoides, donde reconocen y eliminan antígenos exógenos (107-108). La mayoría de las células que participan en la respuesta inmune primaria sufren apoptosis (109), aunque un pequeño porcentaje se diferencian en células T memoria de larga duración (109-111).

En función de su perfil de citoquinas, respuesta a quimioquinas e interacción con otras células, las células Tef se diferencian en células Th1, Th2, Th9 o Th17 (entre otras), que producen diferentes tipos de respuesta inflamatoria (Figura 9).

La producción de IFN- γ e IL-12p70 caracteriza a los linfocitos Th1, mientras que la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 caracteriza a los linfocitos Th2. Ambas subpoblaciones se desarrollan a partir de los linfocitos T vírgenes y el patrón que las diferencia viene determinado por los estímulos presentes en las primeras fases de la respuesta inmunológica durante el momento de la presentación antigénica.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

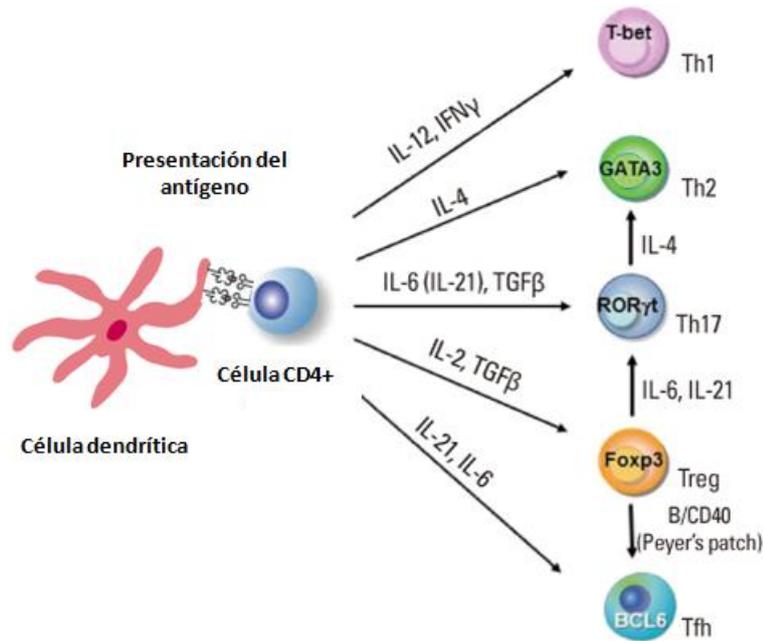


Figura 9. Secuencia de presentación del antígeno Según la combinación de citoquinas reconocidas por la célula CD4⁺ virgen (naive), se diferenciará hacia una subpoblación celular u otra.

Las citoquinas iniciadoras de la cascada de diferenciación de las células Th1 son IFN- γ e IL-12 (112). La IL-12 es producida en grandes cantidades por las CD tras su activación a través de los receptores de reconocimiento de antígenos (113-115). Esta secreción de IL-12 activa a las células NK, que producen IFN- γ . El factor de transcripción que regula la diferenciación de las células Th1 es el T-bet, que estimula la producción de IFN- γ (116) y, además, suprime la diferenciación en otras poblaciones de células como son las Th2 y Th17 (117-118).

Los linfocitos Th1 están implicados en la defensa mediada por fagocitos frente a infecciones, especialmente las producidas por microorganismos intracelulares. Estas células activan a los macrófagos para que se eliminen los microorganismos fagocitados. Además, este subtipo celular es característico de reacciones alérgicas a fármacos de tipo IV (119-120).

Las citoquinas IL-4 e IL-2 estimulan la diferenciación de las células Th2. El factor de transcripción más importante implicado en su diferenciación es el STAT6 (factor 6 transductor de señales y activador de la transcripción, del

I. Introducción

inglés “signal transducer and activator of transcription 6”), inducido por IL-4, el cual produce una sobreexpresión de *GATA3* (factor de transcripción de la proteína 3 de unión a la secuencia GATA, del inglés “GATA binding protein”) (121-123). *GATA3* inhibe la diferenciación hacia Th1, presumiblemente por medio de una interacción con T-bet (124). Se sabe que *GATA3* es indispensable para el correcto funcionamiento de la respuesta Th2, ya que la ausencia de este factor de transcripción produce la interrupción de la diferenciación hacia este fenotipo celular (124-126). Esto se ha visto en experimentos con ratones deficientes en *gata3*, en los que la diferenciación de células T vírgenes se dirigió hacia un fenotipo Th1 (125).

En el caso concreto de la respuesta alérgica frente a alérgenos, las células efectoras que participan son Th2 productoras de IL-4, IL-5 e IL-13 (127-131) y probablemente otras productoras de IL-25, IL-31 e IL-33, que contribuyen a la respuesta Th2 e inflamación (132-136).

En los últimos años, se ha definido una nueva subpoblación de células Th2, las denominadas Th9, que son inducidas por el TGF- β en presencia de IL-4 y se caracterizan por la producción de IL-9 e IL-10, que promueven la inflamación de tejidos (137-138). En la diferenciación de estas células, el IRF4 (del inglés “Interferon regulator factor 4”) juega un papel importante, ya que se une al promotor de IL-9 induciendo su transcripción (139). Si bien se ha demostrado, en pacientes con asma alérgico, que dicha población participa en la respuesta inflamatoria específica del alérgeno (140-141), aún no se conoce del todo su función, aunque parece que la IL-9 producida en estas células puede actuar como factor de crecimiento y diferenciación de otras células efectoras (137).

Las citoquinas implicadas en la diferenciación de las células Th17 son IL-6, IL-21, IL-23 y TGF- β , siendo ésta última clave en la diferenciación de esta subpoblación celular (142-146). El receptor nuclear ROR γ t actúa como regulador de la diferenciación de Th17 e iTreg (Treg inducidas), aunque presenta funciones antagónicas en ambos tipos celulares. Así, cuando hay en el

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

medio una alta concentración de TGF- β , se produce la diferenciación hacia células iTreg, ya que se induce *FOXP3* (147-148). Sin embargo, a baja concentración de TGF- β y en presencia de IL-6, se induce la diferenciación hacia Th17. Las células Th17 se caracterizan por la producción de IL-17 A, IL-17 F, IL-6, IL-8, TNF- α , IL-22 e IL-26 (143, 149-154). Algunos estudios han demostrado que la inhibición de IL-17 y las funciones de las células Th17 reducen la infiltración de neutrófilos y aumenta la infiltración de eosinófilos en modelos experimentales de asma (155-156)

e) Células T reguladoras

Toda respuesta inmunológica efectora ha de tener un control. Una de las vías de regulación inmune mejor explorada es la mediada por células Treg, cuyo papel en el control de la enfermedad alérgica en humanos ha sido demostrado (157). Las células Treg se clasifican, según su origen, en células Treg naturales y adaptativas (Figura 10).

- I. Células Treg naturales. Son células T CD4⁺ y CD8⁺ que se forman en el timo con un programa ya definido para ejercer la supresión sobre aquellas células T que reaccionan contra un antígeno propio. Su función es el control en órganos linfoides secundarios de las células T autorreactivas que escapen a la selección negativa, asegurando así la tolerancia periférica.
- II. Células Treg adaptativas o inducidas. Son células T CD4⁺ que se desarrollan también en el timo pero, a diferencia de las anteriores, adquieren su actividad supresora en la periferia. Su función es regular la respuesta no sólo contra antígenos propios sino también frente antígenos extraños. Estas células a su vez se dividen en (158-159):
 - 1) Células T colaboradoras tipo 3 (Tc3), que se inducen por la administración oral de un antígeno.

I. Introducción

- 2) Células T reguladoras 1 (Tr1), que se inducen por la administración del antígeno en presencia de IL-10.

Tanto las células Treg naturales como las adaptativas son antígeno específicas, pero ejercen su función reguladora por distintas vías. Las células Treg naturales necesitan el contacto célula-célula; en cambio las células Treg adaptativas liberan al medio citoquinas supresoras de la actividad, como el TGF- β en células Tc3 (159), o IL-10 para el caso de las células Tr1 (158).

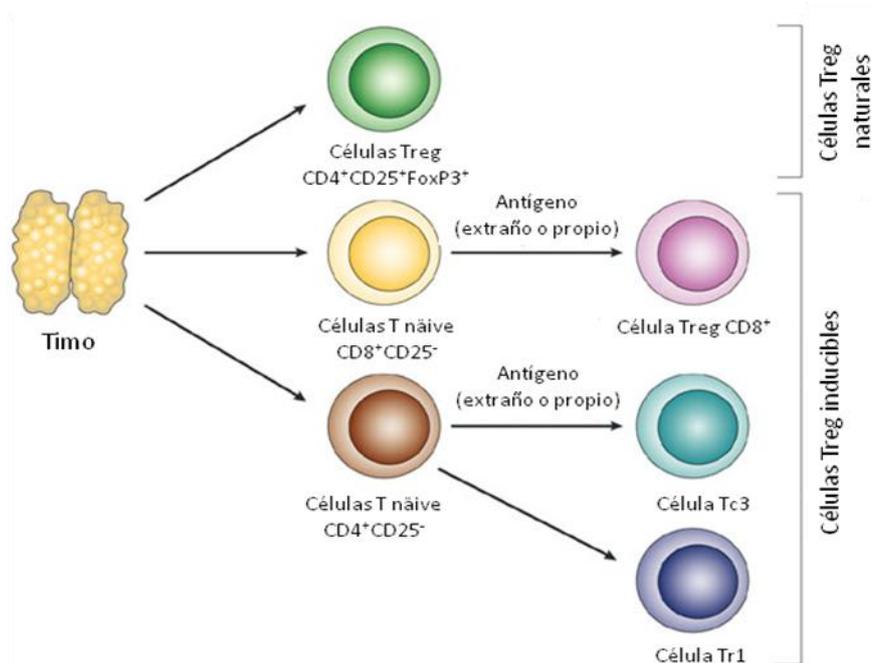


Figura 10. Subclases de células T reguladoras y su origen. Imagen modificada de Mills (2004) (160).

Las células Treg naturales fueron las primeras en identificarse debido a la expresión constitutiva de la cadena α del receptor de alta afinidad para IL-2 (IL-2R), denominado CD25 (161). Sin embargo, también se sabe que, tras la activación de las células T, se induce la expresión del IL-2R, por lo que las células Tef también pueden expresar el CD25. Por ello, se trató de diferenciar fenotípicamente a las Treg de las Tef gracias a su mayor intensidad en la expresión de CD25 (CD4⁺CD25^{high}) (162). Además, se han sugerido otros marcadores celulares, como el antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

(CTLA-4, del inglés “Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4”) (163), el receptor de la familia del TNF inducido por glucocorticoides (GITR, del inglés “Glucocorticoid-Induced Tumour Necrosis Factor Receptor-related gene”) (164) y el gen de activación de linfocitos (LAG-3, del inglés “Lymphocyte-Activation Gene-3”) (165) que si bien no se expresan consistentemente en las células Treg, también pueden ser detectados en otros tipos celulares tales como linfocitos T activados (tanto CD4⁺ como CD8⁺, para el caso de CTLA-4).

La proteína Foxp3, un miembro de los factores de transcripción de la familia de proteínas *forkhead*, que juegan un papel importante en la regulación de la expresión de genes implicados en el crecimiento celular, proliferación, diferenciación y longevidad, se ha utilizado como marcador de las células Treg naturales (166) y de algunas Treg inducidas, mostrándose la presencia de Foxp3 mayoritariamente en células CD4⁺CD25^{high} (162). Algunos estudios (167-168) demuestran que la disminución de la expresión del CD127 (receptor de la cadena α de IL-7, IL7-R) facilita la detección de las células Treg Foxp3⁺. Además, otros autores proponen que el CD127 también podría ser un marcador útil para purificar las células Treg adaptativas (los subconjuntos Tr1 y Tc3) (167).

Las Treg pueden suprimir las respuestas efectoras en las reacciones alérgicas a través de varios mecanismos: suprimiendo la degranulación de células efectoras inducida por el alérgeno específico (169), inhibiendo el reclutamiento de eosinófilos y otras células efectoras a los tejidos inflamados (170), y promoviendo la producción de IgG4 e inhibiendo la producción de IgE actuando sobre los linfocitos B (171). Las Treg pueden interactuar con células alojadas en tejidos para contribuir a un cambio de patrón de respuesta alérgica y promover la generación de CD con fenotipo tolerogénico. Estas funciones se realizan a través de diferentes mecanismos de supresión: citoquinas inhibitorias (IL-10, TGF- β), citolisis (secreción de moléculas citotóxicas como granzima), mecanismos de disrupción metabólica (CD25, AMPc y adenosina), y mecanismos que tienen a las CD como diana (CTLA-4, PD-1) (172-173).

Con respecto a la acción de IL-10 y TGF- β , se ha observado que la IL-10 regula la respuesta efectora mediante la inhibición de la proliferación específica del alérgeno de las células T (174-176) debida al bloqueo de una serie de receptores (CD2, CD28 e ICOS (176)). Por otro lado, el TGF- β ha demostrado tener un papel importante en la conversión de células CD4⁺CD25⁻ a CD4⁺CD25⁺, mediante la inducción de *FOXP3* (147). Además, se ha observado que el aumento de la inflamación alérgica tras el bloqueo de CTLA-4 está asociado con una disminución de TGF- β en lavado broncoalveolar en modelos animales (177). El TGF- β tiene un papel modulador de la respuesta inmune efectora y reguladora, generando, por un lado, células Th9 productoras de IL-9 e IL-10, a partir de células Th2 (137-138); y, por otro, células Treg mediante el incremento de la expresión de *FOXP3* (147).

f) Linfocitos B

Los linfocitos B representan aproximadamente el 10-15% del total de linfocitos circulantes y son los encargados de la producción de anticuerpos específicos frente a los antígenos reconocidos, dirigiendo la respuesta inmunológica hacia una respuesta humoral. Se originan a partir de las células precursoras hematopoyéticas de la médula ósea. Durante las primeras etapas de su desarrollo se produce un reordenamiento génico en las inmunoglobulinas (178), con un número tal de recombinaciones posibles que hace que se puedan expresar anticuerpos capaces de reconocer hasta 5×10^{13} antígenos diferentes.

Debido a este gran abanico de especificidades de los anticuerpos producidos, el primer reto del sistema inmune es encontrar un equilibrio entre un gran abanico de anticuerpos específicos, evitando la autorreactividad, para lo que las células pasan diferentes puntos de control. El primero de ellos supone la diferenciación de las células pro-B en pre-B (179). En este momento se producen diferentes cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos, además de la transducción de la señal de Ig- α e Ig- β , que permiten la formación del complejo receptor de antígenos de células pre-B (BCR). El BCR (del inglés "B-cell receptor") inhibe la función y expresión de la maquinaria enzimática de

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

recombinación de las cadenas H (180) e inicia la recombinación de los genes de las cadenas L. El segundo punto de control consiste en una selección negativa de aquellas células que reconocen autoantígenos. Finalmente, las células B inmaduras migran desde la médula ósea hacia el hígado, donde se terminan de diferenciar y se transforman en linfocitos B maduros o vírgenes (181).

En ausencia de un estímulo antigénico estas células mueren por apoptosis en pocos días. En la respuesta primaria, el proceso de activación lleva a la generación de células B memoria, responsables de la memoria inmunológica (Figura 11). En un segundo contacto con el alérgeno, las células B memoria se diferencian en subpoblaciones productoras de anticuerpos denominados plasmablastos (182).

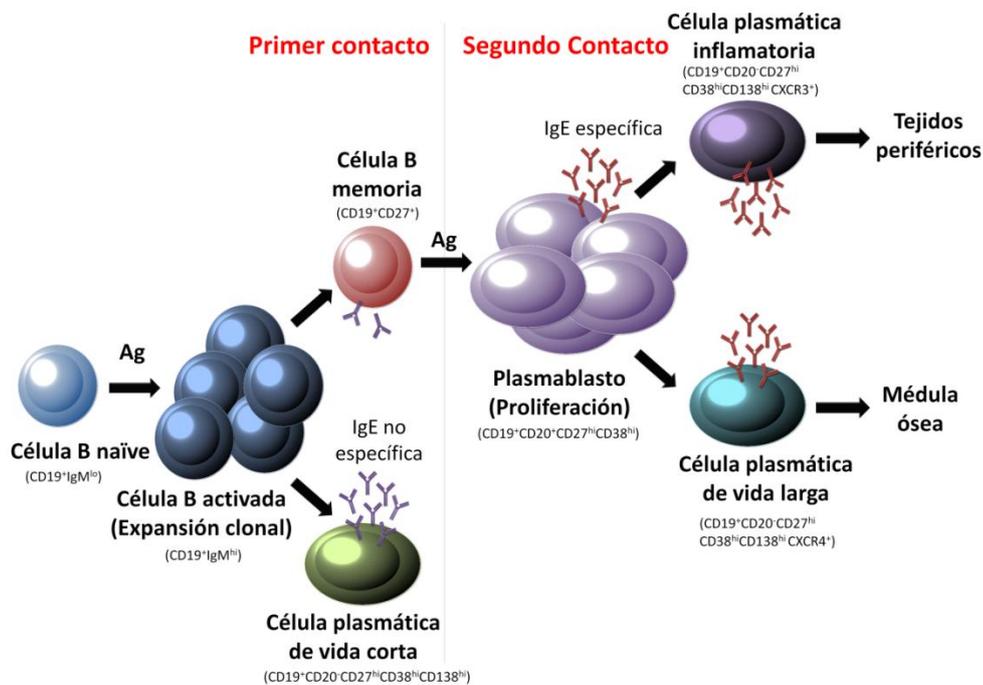


Figura 11. Secuencia de diferenciación celular de los linfocitos B.

Los plasmoblastos abandonan los nódulos linfáticos y maduran, produciendo células plasmáticas. Algunas células plasmáticas, como las células plasmáticas de vida larga (CPVL), expresan el receptor CXCR4 (183-185) y migran hacia la médula ósea, donde pueden permanecer años (184, 186-187). Estas CPVL están completamente diferenciadas y no se dividen, por lo que

I. Introducción

necesitan señales de supervivencia para mantenerse con vida, como por ejemplo IL-6 y ligandos para CD44 como el ácido hialurónico (188).

Otra posibilidad es que los plasmablastos migren hacia los tejidos inflamados, en cuyo caso se denominan células plasmáticas inflamatorias (CPI) (189). Las CPI son responsables del incremento de los niveles de anticuerpos durante una respuesta alérgica y, por tanto, consideradas como efectoras de esta respuesta. Debido a la constante producción de IgE, podemos encontrar niveles elevados en suero durante mucho tiempo (190), sensibilizando a mastocitos y basófilos (191).

El desarrollo de las células plasmáticas depende de varios factores, entre los que se incluyen la presencia de IL-21 (192), la activación del gen *PRDM1* (del inglés "positive-regulatory-domain containing 1") que codifica para el factor de transcripción BLIMP1 (del inglés "B-lymphocyte-induced maturation protein 1") (193) y la expresión del factor de transcripción *XBPI* (del inglés "X-box-binding protein 1") (194).

Recientemente se ha identificado una subpoblación de células B, las denominadas células B reguladoras (Breg), que pueden tener especial interés en las reacciones alérgicas así como en el desarrollo de tolerancia frente a alérgenos (195-197). Aunque las Breg presentan diferentes mecanismos de acción, el más estudiado es el mediado por IL-10, citoquina supresora de las reacciones inflamatorias mediadas por células T (198-199). Otro mecanismo supresor estudiado en estas células es el mediado por TGF- β (198), aunque es menos frecuente.

2.4.2. Alérgenos implicados en la rinitis alérgica

Actualmente no se conoce bien cuáles son las características necesarias para que una proteína sea alergénica. Lo que se sabe es que las señales necesarias para que la respuesta inmunológica derive en una activación de linfocitos Th2 (200) se deben encontrar en el medio cuando se realiza la presentación del antígeno por parte de las CPA al linfocito T virgen (201).

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

La mayoría de las proteínas alergénicas desempeñan importantes funciones biológicas. Se trata de proteínas que pueden mostrar actividad enzimática, tanto reguladora como inhibidora, y proteínas implicadas en el transporte (202). Por ejemplo, las profilinas son proteínas reguladoras implicadas en el ensamblaje del citoesqueleto celular de actina, y el alérgeno mayor del polen de abedul (Bet v 1) y la mayoría de los alérgenos de los ácaros del polvo muestran actividad enzimática (203-204).

Los alérgenos inhalados o aeroalérgenos son aquellos a los que el sujeto se expone de forma natural por vía inhalatoria y generalmente son los responsables de la RA y del asma alérgico. Son, en general, proteínas pequeñas (10-60 kDa), cuya solubilidad en medios acuosos facilita su liberación desde las partículas inhaladas al llegar al sistema respiratorio. Estas partículas volátiles pueden ser de origen diverso (heces, polen, esporas) y su tamaño determina el tiempo de permanencia en el aire y, por lo tanto, el grado de exposición al alérgeno.

Los aeroalérgenos, pueden clasificarse según su fuente de origen en varios grupos: pólenes, ácaros, epitelios de animales y hongos, entre otros (205). La prevalencia de sensibilización a los diferentes aeroalérgenos varía en función del área geográfica. Así, en nuestro medio, los pólenes y los ácaros del polvo doméstico son dos de las principales fuentes alergénicas, junto con los epitelios de animales y hongos, responsables de la RA.

a) Pólenes

El grano de polen es el gametofito masculino en el reino vegetal. Según su modo de transporte podemos distinguir pólenes entomófilos y anemófilos, según sean transportados desde la flor masculina a la femenina por insectos o por el aire, respectivamente. Los anemófilos son las más importantes para los pacientes alérgicos ya que su tamaño (10-100 μm) les permite depositarse en la mucosa nasal y conjuntival, liberando posteriormente proteínas alergénicas.

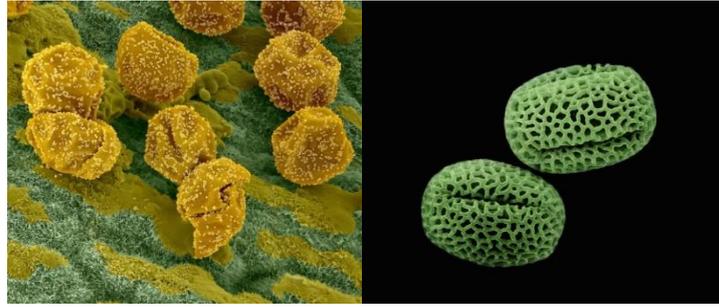


Figura 12. Polen de ciprés (izquierda) y olivo (derecha) (imagen de ME.) (206).

Los pólenes alergénicos más importantes en nuestro entorno son los de las familias *Poaceae*, *Compositae*, *Urticaceae*, *Chenopodiaceae* y árboles de las familias *Betulaceae*, *Oleaceae*, *Fagaceae*, *Platanaceae*, *Cupressaceae* y *Pinaceae* (35). Concretamente, las características geográficas y climáticas del área mediterránea promueven el crecimiento de una vegetación típica con la presencia de varias especies alergénicas, tales como *Parietaria judaica* (*Urticaceae*), *Olea europaea* (*Oleaceae*), varios miembros de la familia *Cupressaceae*, junto con *Artemisia* y varias especies de gramíneas (207-209) (Figura 12).

b) Epitelios animales

Es común que las familias convivan con mascotas, por lo que se produce una continua exposición a alérgenos producidos por los animales y la posible sensibilización a éstos. Existe una gran cantidad de alérgenos de origen animal, pero los más comunes son los de gato y perro. En el caso del gato el alérgeno principal es Fel d 1, producido por las glándulas sebáceas del animal y que, tras acicalarse, se extiende por todo el cuerpo. En el caso del perro, el alérgeno principal es Can f 1, al que reaccionan aproximadamente el 90% de los alérgicos a los perros. Otros animales que pueden producir sensibilización son los ratones, y los caballos y otros animales de granja (vacas, cerdos, etc.)

c) Hongos

Las esporas del hongo *Alternaria alternata* son las responsables de la mayor parte de los casos de alergia a hongos (210). El alérgeno principal es Alt a 1, responsable de la alergenicidad en el 80% de los casos (211). Otros hongos

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

con capacidad alergénica pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cladosporium*.

d) Ácaros del polvo doméstico

Pertenecen al filo artrópodo, a la clase arácnidos y a la subclase *Acari*. Se han descrito más de 40.000 especies de ácaros, aunque los más relevantes desde el punto de vista alergológico son los presentes en el entorno doméstico, que pertenecen a la familia *Pyroglyphidae* e incluyen los géneros *Dermatophagoides* y *Euroglyphus* (212). Los principales factores ambientales que influyen en la presencia de ácaros son la temperatura y la humedad relativa. Estas condiciones explican que el género *Dermatophagoides* sea el más prevalente en nuestra área y, de forma particular, la especie *D. pteronissinus* (DP) (Figura 13).

En los últimos años, con ayuda de las técnicas de biología molecular, se han identificado varios alérgenos de los ácaros y, en algunos casos, se han determinado sus funciones biológicas. Esto ha permitido clasificarlos en 4 grupos: alérgenos con función enzimática (grupos 1, 3, 4, 6, 8, 9, 15, 18 y 20), con función de unión a ligandos (grupos 2, 13, 14 y 17), con actividad sobre el citoesqueleto (grupos 10, 11 y 16) o con actividad biológica desconocida (grupos 5, 7 y 12). Así, de los alérgenos identificados en DP, algunos tienen función enzimática como Der p 1 (cisteína proteasa), Der p 3 (tripsina), Der p 4 (amilasa), Der p 6 (quinotripsina), Der p 8 (glutación-S-transferasa), Der p 9 (serina proteasa colagenolítica), Der p 15 (quitinasa) y Der p 20 (arginina quinasa); otros tienen función de unión a ligandos, como Der p 2 (proteína transportadora de colesterol), Der p 13 (proteína transportadora de ácidos grasos) y Der p 14 (función similar a apolipoforina), Der p 10 y Der p 11 tienen actividad sobre el citoesqueleto (tropomiosina y paramiosina, respectivamente) y Der p 5, Der p 7, Der p 18 y Der p 21 no tienen una función biológica conocida (213).



Figura 13. *Dermatophagoides pteronissinus* (imagen de M.E., tomada de Laboratorios LETI).

Más del 80% de los pacientes con alergia respiratoria por ácaros posee IgEe para Der p1, considerándose el alérgeno mayoritario de dicha especie (214-215). Der p 1 es una proteína de 25 kDa con función cisteína proteasa, mediante la cual, como ocurre con el resto de alérgenos con actividad enzimática, puede alterar el epitelio respiratorio y aumentar la permeabilidad de la mucosa, facilitando el acceso del alérgeno a las CPA.

Se ha demostrado que 100 ácaros o 2 µg de alérgenos por gramo de polvo son suficientes para sensibilizar durante la infancia y con 500 ácaros o 10 µg de Der p1 por gramo de polvo la sensibilización del paciente muestra un riesgo relativo de 5 de desarrollar asma (216-217).

2.5. Diagnóstico

El diagnóstico de la RA se basa fundamentalmente en una evaluación clínica. La historia familiar de alergia, la estacionalidad de los síntomas, la coincidencia de síntomas oculares y nasales, y la relación con la exposición a epitelios, a pólenes o a polvo doméstico, son datos clínicos con alto valor predictivo en el diagnóstico de sospecha de RA. Pero además para establecer su diagnóstico es imprescindible poner en evidencia la presencia de IgEe, libre o fijada a células, mediante técnicas *in vivo* e *in vitro*.

2.5.1. Diagnóstico *in vivo*

a) Prueba cutánea e intradérmica.

La prueba cutánea o *prick* es el instrumento fundamental para demostrar una reacción alérgica IgE mediada (Figura 14), siendo el método de referencia por su relativa sencillez técnica, comodidad para el paciente, rapidez, bajo coste, seguridad, alta sensibilidad y su alta correlación con los síntomas. Demuestra la existencia de IgEe en la superficie de los mastocitos dérmicos y en pacientes sensibilizados desencadena una respuesta cutánea inmediata. Es necesario previamente conocer los aeroalérgenos más prevalentes de la zona y utilizar extractos alérgicos biológicamente estandarizados. Para su realización se aplican los extractos sobre la superficie del antebrazo y se perfora la piel con una lanceta estéril, de manera que se ponen en contacto los mastocitos de la dermis con el alérgeno, generando un prurito en caso de positividad del paciente. Este método está contraindicado, debido a los problemas de interpretación, en pacientes con dermatografismo. Los pacientes con RAL presentan falsos negativos en esta prueba (218-219).



Figura 14. Imagen de una prueba cutánea.

El test intradérmico sigue el mismo principio que el *prick*, con la diferencia de que el alérgeno se administra de forma subcutánea, formando una pequeña ampolla, realizándose la lectura tras 15 minutos. Esta prueba tiene una mayor sensibilidad que el *prick*, por lo que se usa más frecuentemente en el diagnóstico de alergias frente a fármacos.

Una semana antes de la realización de ambas pruebas se deben retirar los antihistamínicos orales y los tópicos cuatro días antes. Test de provocación nasal con alérgeno.

b) El test de provocación nasal (TPN)

Es la forma de reproducir de modo controlado la respuesta de la mucosa nasal a alérgenos, irritantes u otras sustancias desencadenantes. La respuesta se caracteriza por prurito nasal, estornudos en salvas, rinorrea y edema de la mucosa nasal. En la RA está indicado principalmente en los pacientes sensibilizados a varios alérgenos para valorar la significación clínica de cada uno de ellos (220) siendo el único método diagnóstico de la RAL. También está indicado para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la respuesta nasal a alérgenos o fármacos.

La provocación nasal no tiene contraindicaciones. Para su realización se debe retirar el tratamiento con antihistamínicos orales una semana antes y cuatro días antes para los antihistamínicos tópicos. La estandarización de los extractos alérgicos es fundamental para la precisión, seguridad y reproducibilidad de cualquier procedimiento diagnóstico, incluida la provocación nasal. Por eso es preferible que los alérgenos se reconstituyan el mismo día de la prueba. En la práctica clínica habitual es recomendable la aplicación de diferentes concentraciones para poder valorar la dosis/respuesta, y así poder conocer la sensibilidad del paciente a dicho alérgeno.

Se utiliza como concentración de inicio la necesaria en la prueba cutánea para producir una pápula de 3 mm de diámetro o bien una dilución 1/100 de la concentración utilizada en un *prick* positivo. Es importante la administración previa del diluyente (suero fisiológico o suero fisiológico con seroalbúmina humana 0,03%) para valorar el posible efecto irritante, que podría repercutir en la interpretación de la prueba.

c) Rinometría acústica.

Es una técnica reproducible y rápida y no está impedida por una obstrucción nasal intensa. Las áreas nasales medidas por rinometría acústica se han comparado con las mediciones obtenidas por tomografías computarizadas, encontrándose una buena correlación.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

Su principio físico se basa en la propagación de una onda sonora en la cavidad nasal que es parcialmente absorbida y reflejada en la mucosa nasal. El sonido reflejado se analiza por ordenador y los resultados obtenidos se visualizan en una gráfica donde aparecen las áreas en función de la distancia de las narinas, por lo que también obtenemos una información tridimensional.

Se puede valorar la localización de la obstrucción en función de la distancia a la que se encuentre el área transversa mínima (ATM). El descenso del 20-30% en áreas o volúmenes se considera como criterio de positividad en las provocaciones nasales con alérgeno (221-222). En el caso de la RAL, esta técnica es útil para el diagnóstico, puesto que detecta perfectamente la reducción del volumen de la fosa nasal producido durante la respuesta alérgica.

2.5.2. Métodos *in vitro*

a) Determinación de IgE sérica total y específica.

Su determinación puede realizarse por diversos métodos de inmunoanálisis. La determinación de la IgEe es una prueba semicuantitativa útil en el diagnóstico etiológico de la RA cuando las pruebas cutáneas no se pueden realizar o su interpretación es difícil o discordante con la historia clínica. Si la determinación de la IgEe se realiza con alérgenos estandarizados se correlaciona bien con las pruebas cutáneas, pero a pesar de ello hay que considerar que es menos sensible que éstas últimas (223-224). Debido a que los pacientes de RAL no poseen IgEe en suero, esta técnica no es válida para su diagnóstico.

b) Test de activación de basófilos.

El test de activación de basófilos (TAB) es un ensayo funcional que simula *in vitro*, la activación inducida por el alérgeno *in vivo* al ser reconocido por la IgEe presente en la membrana de basófilos circulantes (225-226). El análisis de los basófilos activados se determina generalmente por la expresión en la superficie celular de dos glicoproteínas, CD63 y CD203c, mediante citometría de flujo.

I. Introducción

Para valorar la positividad de la prueba se usan el porcentaje de activación (expresión) de CD63 o CD203c, el índice de estimulación (cociente entre el porcentaje de basófilos activados con los diferentes alérgenos y el porcentaje de basófilos activados sin estímulos), o el cd-sens (227), entre otros. El punto de corte a partir del cual se considera positivo un índice de estimulación se calcula a mediante curvas ROC para cada antígeno, y suele ser superior a 2 (228-230). Los resultados del TAB no se ven afectados por la toma de antihistamínicos (231). Este test ha demostrado ser de utilidad en la evaluación de RAL frente a ácaros y polen de olivo (232-233).

2.6. Tratamiento de la rinitis alérgica

El tratamiento de la RA debe ir encaminado a tratar la inflamación alérgica subyacente, que es persistente, aunque el paciente permanezca asintomático y que debe ser controlada para prevenir su cronificación (234).

La estrategia del tratamiento consta, en general, de medidas de evitación alérgicas y educación sanitaria, tratamiento sintomático e inmunomodulador.

2.6.1. Evitación

Diversos estudios y meta-análisis sobre la eficacia de la evitación y reducción de alérgenos en el ambiente doméstico han demostrado que, aunque se pueda disminuir la carga alérgica ambiental, no son muy eficaces en la reducción de síntomas (235-236). Sin embargo, en otras ocasiones estas medidas tampoco son suficientes para reducir dicha carga (237).

2.6.2. Tratamiento sintomático

En la fisiopatología de la RA participan diversos mediadores, entre los que destaca la histamina, que es la responsable del prurito, la rinorrea y los estornudos. Hoy día se dispone de un arsenal terapéutico que cubre la práctica totalidad de los síntomas de la RA. De todos ellos, los más usados son los antihistamínicos de segunda generación, tanto orales como tópicos, y los corticoides tópicos. Los antihistamínicos actúan bloqueando de forma competitiva y reversible los receptores H1 de la histamina. Los de segunda

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

generación, además, reducen la liberación de otros mediadores, como triptasa, PGD₂ y cisteinil LT, la producción de citoquinas y quininas, la expresión de ICAM-1 y la quimiotaxis de eosinófilos (238).

Los glucocorticoides son los antiinflamatorios más potentes que existen para el tratamiento de la RA. Los glucocorticoides tópicos han demostrado ser el tratamiento más efectivo en la alergia respiratoria, tanto para la rinitis como para el asma. Inhiben la captación y el procesamiento del antígeno, inducen una reducción en el número de CPA (239) así como un descenso significativo en el número de eosinófilos y sus productos en la mucosa nasal, siendo este fenómeno más pronunciado en el epitelio que en la lámina propia (240).

Recientemente, se cuenta con la posibilidad de utilizar anticuerpos recombinantes humanizados anti-IgE, aptos para el tratamiento del paciente con rinitis-asma, con buenos resultados (241).

2.6.3. Tratamiento inmunomodulador

Las terapias que persiguen el restablecimiento de la tolerancia inmunológica (242) han demostrado ser unas herramientas clínicas seguras y efectivas. Con ellas se pretende desviar el patrón Th₂ de la respuesta efectora de una reacción alérgica hacia el patrón Th₀/1, con la generación de células Treg específicas del alérgeno capaces de suprimir las células Tef específicas (157, 243-247).

La inmunoterapia (IT) es, en el momento actual, el único tratamiento que puede alterar el curso natural de la RA e impedir en estos pacientes el desarrollo de asma (235, 248), la aparición de nuevas sensibilizaciones e incluso reducir de forma significativa la presencia de asma bronquial (249). Así, la IT específica no debería ser relegada al final del tratamiento sino ser prescrita en fases tempranas de la enfermedad. Teniendo en cuenta que la eficacia de la IT es mayor en niños que en adultos, se debe instaurar de forma precoz para evitar la inflamación crónica y la reestructuración de las vías respiratorias (39).

La eficacia de la IT es incuestionable en el tratamiento de la RA y asma alérgico, existiendo evidencias de peso en la literatura para su administración tanto por vía subcutánea como sublingual (250-251). Aunque la mayoría de trabajos se centran en el estudio tanto de si el tratamiento con los diferentes tipos de IT, como la vía de administración son seguras, se ha determinado que existe un porcentaje de pacientes que no obtienen una mejoría clínica tras el tratamiento. Se estima que los pacientes no respondedores (NR) a la IT subcutánea específica frente a DP (ITSC-DP) representan aproximadamente un 30% del total de pacientes tratados (252). Debido a esto, es importante conocer las diferencias inmunológicas entre pacientes respondedores (RP) y pacientes NR para la detección temprana de una mala respuesta a la IT, debido al gasto tanto en tiempo como en dinero para sistema de salud y para el propio paciente. Para ello se hace necesaria una mejora en el conocimiento de los mecanismos inmunológicos subyacentes en la IT, que ayuden a identificar biomarcadores de respuesta.

2.7. Mecanismo inmunológico implicado en la IT específica a aeroalérgenos

El mecanismo inmune que subyace en el éxito en la inducción de tolerancia con la IT específica es independiente de la vía de administración. En un estudio realizado con pacientes tratados con IT sublingual frente a varios aeroalérgenos se demostró un restablecimiento de la función inmune innata de las CD (253). Además, estas células producen IL-10 y TGF- β (254), que, junto al aumento demostrado de IFN- γ y un descenso de IL-4 en la respuesta tardía, polarizarían la respuesta desde el fenotipo Th2, típico de reacciones mediadas por IgE, hacia un fenotipo Th1 con implicación de células Treg (255). Las Treg usan múltiples factores para suprimir la actividad efectora de las células Th2, no sólo promoviendo la inducción de IgG4 e IgA, y de IL-10 y TGF- β como factores supresores de la liberación de IgE (256), sino directamente sobre las células Th2, por lo que se dejarían de liberar las citoquinas requeridas para su proceso de alojamiento o *homing*, y para la diferenciación, supervivencia, y

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

actividad de los eosinófilos, mastocitos y basófilos, como son IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (257-260) (Figura 15).

Es precisamente la IgG₄ la que se ha propuesto como un “factor bloqueante” y “competidor” de la producción y unión de IgE a través de su receptor FCεRII (261). Ésta se ve aumentada durante y tras la administración de IT (262-264), y suele presentar buena correlación con la mejoría sintomática (265). La IgG₄ es la subclase menos abundante en plasma. Dentro de las IgG y presenta baja afinidad para la proteína C1q (proteína a la que se unen las Ig y activan el sistema inmune por la vía del complemento) e inhibe la liberación de histamina tras la activación del basófilo a través del receptor FcεRI.

Un efecto interesante de la IT, que hasta el momento no ha sido suficientemente estudiado, es cómo el tratamiento con un alérgeno determinado puede influir en la sensibilización y tolerancia a otros alérgenos relacionados. Según estudios realizados con veneno de himenópteros, la inmunoterapia subcutánea (ITSC) con veneno de abeja (*Apis mellifera*) induce tolerancia para al veneno de serpiente (*Naja mossambica*), debido a la reactividad cruzada a la proteína fosfolipasa A₂, que ambos presentan (266-267).

En la IT con alimentos se ha encontrado reactividad cruzada *in vitro* en células T de ratones sensibilizados (269). Se ha investigado la eficacia de la IT con un fruto seco (anacardo) en el desarrollo de manifestaciones clínicas a otros y se ha encontrado tolerancia frente a pistacho, aunque este hecho no ha podido ser demostrado en el caso de la nuez, probablemente debido a los distintos perfiles de sensibilización y el tipo de alérgenos implicados (los epítomos T de alérgenos como las albúminas 2S muestran una homología muy baja). Recientemente también se ha publicado que la IT sublingual a melocotón desensibiliza al paciente frente a otros alimentos con alérgenos relacionados, como es el caso del cacahuete (270).

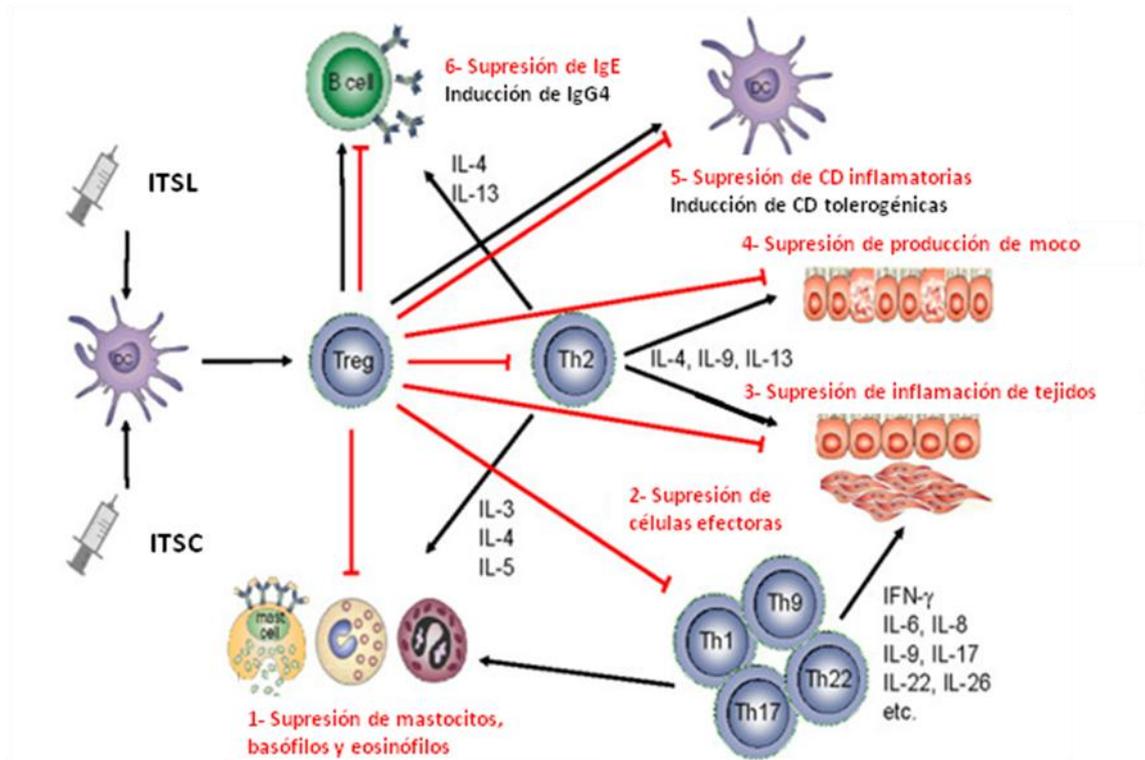


Imagen 15. Mecanismo de acción de la inmunoterapia específica sobre la respuesta inmune. Imagen modificada de Fujita *et al* (2012) (268).

Respecto a los aeroalérgenos, algunos estudios demuestran que la ITSC-DP puede prevenir el desarrollo de nuevas sensibilizaciones en niños con alergia respiratoria (271). También se ha observado la actividad inhibidora *in vitro* de Der p 1 sobre la actividad proteolítica de Der p 6 (272).

Se han descrito muchos parámetros que actúan como marcadores de la eficacia de ITSC (provocación bronquial (252), variaciones en los niveles de inmunoglobulinas (261), descenso de la reactividad de los basófilos (273) o modulación de las células T (274)), pero existen resultados contradictorios sobre su valor predictivo, lo que ha generado un gran debate (275-276). Por ello, es necesario identificar marcadores predictivos de eficacia de la ITSC, que permitan establecer un diagnóstico temprano en aquellos pacientes que puedan beneficiarse de este tratamiento (277). De la misma forma, y aunque se han publicado estudios sobre las subpoblaciones de células B y su importancia en la tolerancia inmunológica (197, 278), no se ha descrito la relación de las subpoblaciones de células B y plasmáticas en la eficacia de la IT.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

Generalmente se atribuyen los beneficios clínicos de la ITSC a un incremento de la subpoblación de Treg (256, 279-281), a pesar de que otros autores no han encontrado este cambio (282-286). Por esto se sugiere que, más que el incremento de frecuencia, la eficacia de la IT pudiera estar relacionada con los cambios en las células T productoras de IL-10 (287), que suprimen la producción de IL-4 por las células Th2 y reducen la producción de IgE por las células plasmáticas (288). Esto indicaría que la efectividad de la IT puede deberse no solo al incremento del número de Treg, sino también al aumento de su actividad supresora. Por ello se debe profundizar en el estudio del efecto de la IT en la actividad supresora de las células Treg sobre la respuesta de las células T específicas del alérgeno.

II. Justificación



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

II. Justificación

En los últimos veinte años la prevalencia de las enfermedades alérgicas respiratorias, rinitis y asma, ha aumentado de forma considerable, particularmente en países con estilo de vida occidental (289), llegando a considerarlas como una de las epidemias del siglo XXI en estos países. El manejo habitual de la enfermedad alérgica respiratoria incluye el tratamiento paliativo sintomático (farmacológico), medidas de educación que incluyen la evitación del alérgeno, que en muchos casos es difícil de conseguir e incluso a veces controvertida, como ocurre en el caso de la alergia alimentaria y la IT específica de alérgeno (35).

Aunque inicialmente la utilidad de la IT fue objeto de debate, en la actualidad y de acuerdo con el informe publicado por la OMS en 1998 (290), se considera que la IT con el alérgeno específico es el único tratamiento etiológico capaz de actuar sobre los mecanismos inmunopatológicos de la enfermedad alérgica. Su eficacia se ha confirmado en revisiones sistemáticas y metanálisis en asma (291) y más recientemente en rinitis (292). El beneficio se mide en términos de mejora de los síntomas y disminución de los requerimientos de tratamiento farmacológico, así como en la mejora de la calidad de vida (293), habiéndose demostrado su efectividad frente a grupos de alérgenos bien caracterizados y altamente prevalentes, como son los pólenes y los ácaros del polvo doméstico (294). Entre estos últimos, DP y *D. farinae* son las fuentes de alérgeno más importantes (62), siendo el DP el sensibilizante más prevalente en España. En los extractos de DP se han identificado más de 30 proteínas alérgicas (295), de los que las más importantes son Der p1 y el Der p2 (296).

La IT presenta la ventaja añadida de inducir beneficios clínicos, tales como remisión durante un tiempo prolongado (297), prevención de nuevas sensibilizaciones alérgicas (271, 298) y reducción de la progresión de la enfermedad de rinitis a asma (299). Este tratamiento se ha aplicado también con éxito con alérgenos que inducen respuesta tras inyección (veneno de himenópteros) y recientemente se están desarrollando intentos con determinados alérgenos alimentarios con resultados variables.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

La cuestión actual no radica en debatir eficacia *versus* no eficacia de la IT, sino, debido a la alta prevalencia de las enfermedades alérgicas, en identificar en cuántos sujetos funciona y cuál es el grado de protección que proporciona, ya que existe un porcentaje de pacientes que no responde de forma adecuada a la IT a pesar de una correcta indicación. De hecho, en la unidad de IT de nuestro servicio, donde se administran más de 80 dosis semanales de IT, un 30% de los sujetos no responde adecuadamente al tratamiento.

Los avances en el conocimiento de los mecanismos inmunológicos implicados en la IT han sido considerables en los últimos años, pero aún son necesarios más estudios especialmente dirigidos a conocer en profundidad los mecanismos que van asociados a la eficacia de la IT.

Tal y como se ha comentado anteriormente, no se conoce el mecanismo exacto por el cual algunos pacientes sometidos a IT no responden correctamente, ni las diferencias inmunológicas con respecto a los pacientes que responden al tratamiento. El estudio de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T y B, tanto en estado basal como durante la ITSC-DP entre estos dos grupos de pacientes podría ayudar a identificar biomarcadores que permitan determinar la respuesta de forma temprana y poder así seleccionar aquellos pacientes con más posibilidades de responder correctamente a la IT.

Por otro lado, y a pesar del papel principal otorgado a las Treg en la inducción de una respuesta de tolerancia durante una IT, se desconoce el mecanismo a través del cual este tipo celular desarrolla su función. Existen resultados discrepantes sobre si el efecto se debe a un incremento en el número de dichas células o a un cambio en la función supresora de esta subpoblación. En consecuencia, la investigación sobre los cambios que produce la ITSC-DP sobre las Treg en los pacientes respondedores nos proporcionaría una visión global de cómo el tratamiento afecta a la actividad de dichas células.

Con los resultados de este estudio se pretende identificar biomarcadores de eficacia de la IT, con objeto de determinar de forma temprana si el paciente

II. Justificación

está desarrollando o no una respuesta adecuada. Este conocimiento puede ayudar los facultativos a monitorizar a los pacientes y a tomar una pronta decisión sobre si continuar o no con un tratamiento que resulta largo y costoso, y aumentar así la eficiencia de los recursos del sistema público de salud. Además, los resultados también ayudarían en la optimización del tratamiento para adaptarlo a los pacientes no respondedores.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

III. Objetivos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

OBJETIVO GENERAL

Monitorizar los cambios inmunológicos producidos en basófilos y diferentes subpoblaciones de linfocitos T (efectoras y reguladoras) y B en un grupo de sujetos con RA sensibilizados a DP durante el tratamiento con ITSC-DP. Además, se evaluarán dichos cambios en relación con la eficacia de la IT.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estudio de los cambios humorales y fenotípicos en las diferentes subpoblaciones celulares durante la IT mediante:
 - a. Determinación de los niveles de Ig (IgEt, IgEe e IgG4e).
 - b. Análisis del perfil de reactividad del basófilo durante la ITSC-DP.
 - c. Análisis de los cambios en el fenotipo de las células T, efectoras (Th1/Th2/Th9/Th17) y reguladoras (Treg), específico frente a DP mediante la determinación de marcadores celulares, citoquinas y factores de transcripción característicos de cada una de las subpoblaciones.
 - d. Análisis del fenotipo específico a DP de diferentes subpoblaciones de linfocitos B.
- 2) Análisis de funcionalidad de las Treg durante la IT para:
 - a) Estudiar la capacidad supresora de las Treg sobre la respuesta proliferativa de las células T efectoras (CD4⁺CD25⁻) y la capacidad de las células iTreg generadas *in vivo* como consecuencia de la IT para restablecer el control de la respuesta alérgica observada en el momento previo a recibir la IT
 - b) Estudiar el mecanismo de supresión de las células Treg inducidas (dependiente de IL-10 o de TGF- β).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

IV. Material y métodos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Diseño del estudio

Se trata de un estudio de seguimiento durante un periodo de 12 meses en pacientes con RA monosensible a DP y sometidos a IT específica a DP, en el que se ha incluido un grupo de pacientes no tratados como grupo control para verificar los objetivos que nos proponemos.

Para garantizar la homogeneidad entre grupos se analizó previamente el tiempo de evolución de la reacción a DP (meses), el sexo y la edad (años) de los pacientes.

1.1. Ámbito

El trabajo experimental se ha desarrollado en el laboratorio de investigación del Hospital Regional Universitario de Málaga (HRUM), perteneciente al Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA). Tanto la evaluación como la selección de pacientes se realizaron en la Unidad de Inmunoterapia de la Unidad de Gestión Clínica (UGC) de Alergología del HRUM. El HRUM es un hospital de tercer nivel y el único centro de referencia para el estudio de patologías alérgicas de la provincia de Málaga, Melilla y Campo de Gibraltar.

1.2. Selección de sujetos

Se incluyeron pacientes diagnosticados de RA monosensible a DP. Estos pacientes se dividieron en dos grupos: un primer grupo que fue sometido a IT específica frente a DP durante 12 meses, y un grupo que no recibió IT y que actuó como grupo control alérgico. La inclusión en el grupo tratado o no tratado se decidió según práctica clínica habitual. Ambos estaban emparejados por evolución de la enfermedad, edad y sexo.

Los criterios de inclusión que se consideraron fueron los siguientes:

- Presentar RA monosensible a DP.
- Edad entre 18 y 55 años.
- Prueba cutánea positiva a DP (diámetro de la pápula >3 mm).

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

- IgEe positiva a DP (ImmunoCAP>0.35 kU/L).
- TPN positivo a DP (puntuación de síntomas + rinometría acústica).
- Firma del consentimiento informado.

Se siguieron los criterios de exclusión siguientes:

- Enfermedades autoinmunes o inmunodeficiencias severas.
- Tratamiento con β -bloqueantes.
- Trastornos psicológicos severos.
- Dermatitis atópica severa.
- Imposibilidad de realizar adecuadamente las pruebas diagnósticas o el tratamiento.
- Sensibilización a otros alérgenos inhalantes (perennes o estacionales) con relevancia clínica para el sujeto y que puedan interferir en la evaluación de la respuesta.
- Tratamiento con IT en los 5 años anteriores a su inclusión en el estudio.
- Volumen espiratorio forzado (FEV, del inglés “forced expiratory volume”) < 70% del valor teórico tras el adecuado tratamiento farmacológico.
- No haber firmado el consentimiento informado.

1.2.1. Normas éticas

El estudio se realizó respetando los principios de la Declaración de Helsinki (Brasil, 2013) de la Asociación Médica Mundial, del Convenio del Consejo de Europa relativo a derechos humanos y biomedicina, de la declaración Universal de la Unesco sobre genoma humano y derechos humanos, y las directrices de la ICH sobre BPC CPMP/ICH/135/95.

El estudio se evaluó y aprobó por el comité de ética del HRUM (Anexo 1). Se obtuvo el consentimiento informado (Anexo 2) firmado de todos los sujetos participantes en el estudio tras recibir información sobre la metodología,

objetivos y riesgos del estudio, que incluye la autorización a realizar el estudio alérgico y la toma de muestras biológicas.

Las muestras obtenidas durante el estudio y los datos clínicos asociados se almacenaron y custodiaron con las garantías de calidad, trazabilidad y confidencialidad que exige la legislación vigente (Ley de Investigación Biomédica 14/2007, RD 1716/2011, LOPD 15/1999) en el Biobanco del HRUM-IBIMA, perteneciente a la red de Biobancos del Sistema Sanitario Público de Andalucía (BSSPA), tras la firma del consentimiento específico de Biobanco (Anexo 3).

1.3. Descripción de la IT

El producto que se utilizó fue Acaroid®, una preparación de alérgeno estabilizada con hidróxido de aluminio que contiene altas concentraciones de alérgenos de DP liofilizados (0,1166 g/L Der p 1 y 0,1 g/L Der p 2). Esta preparación está comercializada por Allergopharma KG (Reinbek, Alemania). Se presenta en dos viales; el vial A y el vial B, siendo el primero una dilución 1:10 del segundo. La vía de administración fue subcutánea.

1.3.1. Calendarios de dosis

Durante la fase de inicio los pacientes recibieron 8 inyecciones subcutáneas en un intervalo de una semana con dosis crecientes (0.1, 0.2, 0.4, y 0.6 cc, primero del vial A y luego siguiendo el mismo protocolo del vial B), seguida de una dosis de 0.6 cc del vial B dos semanas más tarde. Posteriormente durante la fase de mantenimiento los pacientes recibieron 0.6 cc del vial B cada 4 semanas (Tabla 1). En caso necesario se modificó la dosis y la temporalización de la vacuna bajo prescripción médica, siempre siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los pacientes estuvieron bajo supervisión médica durante al menos 30 minutos tras la administración de la dosis de la vacuna, y en caso de presentar síntomas nasales, oculares o bronquiales se administró medicación de emergencia (oral, nasal y ocular antihistamínicos, corticoesteroides nasales,

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

vasoconstrictores nasales, beta2-agonistas y corticoesteroides inhalados) necesaria para la resolución de la sintomatología.

Vial	Intervalo de tiempo de la administración de la dosis	Dosis administrada (cc)
A	7 días	0.1
		0.2
		0.4
		0.6
B	7 días	0.1
		0.2
		0.4
		0.6
	14 días	0.6
1 mes	0.6	

Tabla 1. Calendario de la administración de la IT.

1.3.2. Evolución clínica de los pacientes

La respuesta clínica se evaluó siguiendo los indicadores de la EAACI (300), que incluye la media diaria de la puntuación de síntomas de rinoconjuntivitis y la medicación tomada habitualmente. Los pacientes por sí solos mantuvieron una evaluación diaria durante el mes previo a las visitas de evaluación clínica (basal, 1, 3, 6 y 12 meses) del uso de medicación y 5 síntomas de rinoconjuntivitis (estornudos, rinorrea, picor de nariz, obstrucción nasal y síntomas oculares) siguiendo una puntuación de 4 puntos: 0: no hay síntomas; 1: síntomas leves; 2: síntomas moderados; 3: síntomas severos para ninguno de ellos. La puntuación diaria máxima corresponde a 15 puntos. La puntuación de consumo de medicación fue: 1 punto para antihistamínicos orales, 2 puntos si también se usaron corticoesteroides nasales y 3 puntos para el uso de corticoesteroides orales. Además, en cada visita se realizaron pruebas cutáneas intradérmicas, test de provocación nasal y se extrajeron muestras para determinaciones *in vitro*, siempre antes de la administración de la vacuna.

Tras el primer año de tratamiento y tras la evaluación *in vitro*, los pacientes se clasificaron como respondedores o no respondedores a la IT en base a la evolución de los síntomas y al consumo de medicación para paliar los síntomas, clasificándose como respondedores cuando ambas puntuaciones disminuyeron al menos un 20%.

2. Metodología

2.1. Pruebas *in vivo*

2.1.1. Pruebas cutáneas e intradérmicas.

Se llevaron a cabo según el protocolo descrito por la EAACI (301-303) en las diferentes visitas previas y durante la ITSC-DP. Las pruebas cutáneas o *prick* se realizaron para el diagnóstico de los pacientes y se hicieron con una batería de 17 alérgenos comunes inhalantes, incluyendo pólenes, ácaro del polvo, moho y epitelios animales, entre otros (ALK, Madrid, España) (Tabla 2).

Las pruebas cutáneas intradérmicas para el seguimiento de los pacientes se hicieron exclusivamente con extracto de DP (0.4 mg/mL) (ALK) liofilizado recién reconstituido y con los controles positivos y negativos mencionados anteriormente. Los resultados se expresaron en mm² y se consideraron positivos cuando se incrementó el diámetro de la ampolla 3 mm mayor que el control negativo.

Grupo	Nombre	Nombre común
Pólenes	Gramíneas (<i>Phleum pratense</i> + <i>Lolium perenne</i>)	Gramíneas (Hierba timotea + Ballico)
	<i>Cupressus sempervirens</i>	Ciprés
	<i>Olea europaea</i>	Olivo
	<i>Chenopodium album</i>	Cenizo
	<i>Plantago psyllium</i>	Plantago
	<i>Artemisia vulgaris</i>	Artemisia
	<i>Parietaria judaica</i>	Parietaria
	<i>Salsola khali</i>	Salsola
	<i>Ricinus communis</i>	Ricino

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

Grupo	Nombre	Nombre común
Ácaros	<i>Lepidoglyphus destructor</i>	Ácaro de almacén
	<i>Dermatophagoides pteronissinus</i>	Ácaro del polvo
	<i>Dermatophagoides farinae</i>	Ácaro del polvo
Hongos	<i>Alternaria alternata</i>	Alternaria
	<i>Aspergillus niger</i>	Aspergillus
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicilium
Epitelios animales	<i>Canis familiaris</i>	Perro
	<i>Felis domesticus</i>	Gato

Tabla 2. Batería de alérgenos inhalantes utilizados en la prueba cutánea.

2.1.2. TPN y rinometría acústica

En primer lugar se realizó un lavado nasal con suero salino para excluir los casos de hiperreactividad nasal. A continuación, en los casos negativos se realizó el TPN con el extracto recién reconstituido y a concentración creciente de DP (0.04, 0.4 y 4 mg/mL) en intervalos de 15 minutos. Se aplicaron dos inhalaciones de la solución a temperatura ambiente en cada fosa nasal. La respuesta al TPN fue evaluada basándose en parámetros objetivos (volumen de las fosas nasales) y subjetivos (puntuación de la escala de síntomas nasales y oculares). La respuesta objetiva se monitorizó mediante rinometría acústica usando un rinómetro acústico (SER 2000 rhinometer, Rhinometrics, Lyngø, Dinamarca) siguiendo las directrices del comité de estandarización de rinometría acústica (304). Se midió el volumen de la cavidad nasal correspondiente al cornete inferior de cada seno nasal (2-6 cm desde la nariz). La respuesta subjetiva se realizó mediante la puntuación de los síntomas usando una escala visual analógica. Dicha puntuación fue otorgada subjetivamente por cada paciente a síntomas de obstrucción nasal, rinorrea, picor, estornudos y síntomas oculares. Cada escala tenía una puntuación de 100 puntos, siendo la puntuación total máxima de toda la prueba de 500 puntos.

Se consideró una respuesta positiva a la provocación cuando se incrementó un 30% o más la puntuación subjetiva de síntomas y un descenso de un 30% o más en el volumen de la fosa nasal, comparado con la medida basal.

2.2. Pruebas *in vitro*

2.2.1. Recogida de muestras y almacenamiento

El personal de enfermería de la UGC de Alergología del HRUM realizó la extracción de sangre periférica usando distintos tubos de acuerdo el tratamiento que se le dio a cada muestra de sangre:

- Tubos con gel para las determinaciones séricas de IgE_t, IgE_e e IgG4 específica (IgG4_e). El suero se obtuvo previa centrifugación de estos tubos a 4000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos. Posteriormente se almacenó a -20°C a la espera de realizar las determinaciones correspondientes.
- Tubos con heparina lítica para realizar el TAB. Para ello se mantuvieron a temperatura ambiente y en agitación suave hasta la realización del test en un periodo inferior a 5 horas. Estos tubos también se utilizaron para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés “peripheral blood mononuclear cells”) para los estudios celulares mediante centrifugación diferencial en gradiente de densidad. Para ello, la sangre total heparinizada se diluyó en una proporción 1:1 en suero salino fisiológico y se dispuso sobre Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, España). Las muestras se sometieron a una centrifugación a 1800 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se recogió el halo blanquecino situado encima del Ficoll-Paque, que contiene la fracción mononuclear (Figura 16). Estas células se lavaron dos veces (10 minutos a 1800 rpm y a 800 rpm, respectivamente) con solución salina. Las células se congelaron en medio RPMI 1640 suplementado con 2 mM de L-Glutamina (BioWhittaker, Pittsburgh, PA, USA), 5 mg/mL de gentamicina (Normon, Madrid), 50 ng/mL de estreptomina, 100

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

UI/mL de penicilina, 40% de suero fetal bovino (BioWhittaker) y 20% de DMSO (Sigma, St. Louis, USA) para su posterior uso. Las muestras se congelaron a -80°C y posteriormente se almacenaron en nitrógeno líquido (-296°C).

- Tubos con EDTA para estudios de expresión génica. Se procesaron de la misma forma que los tubos de heparina lítica.

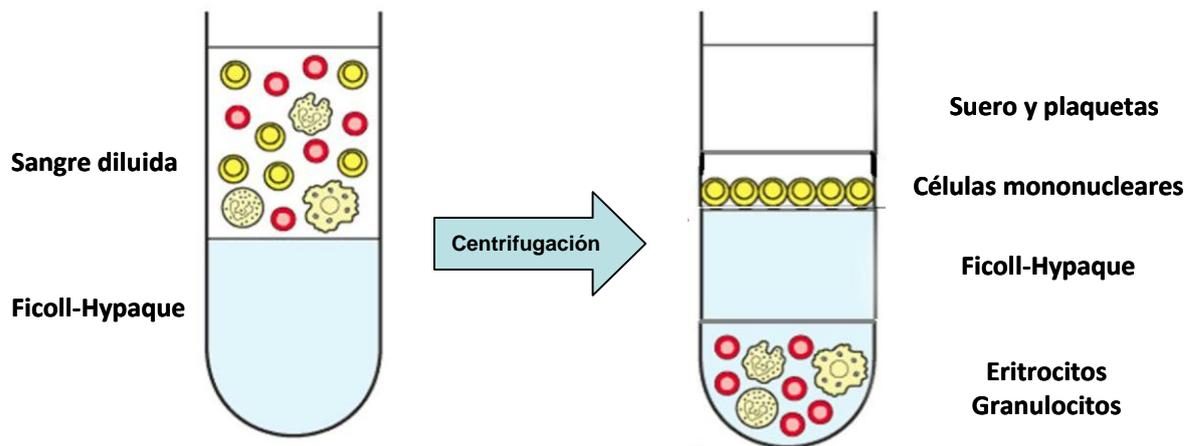


Figura 16. Esquema de la separación celular de las células mediante centrifugación diferencial en gradiente de densidad.

2.2.2. Determinación humoral de IgE total, y de IgE e IgG4 específicas a DP mediante ImmunoCAP

Para medir los niveles de las diferentes Ig circulantes en las muestras de suero se utilizó el sistema ImmunoCAP 100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), un fluoroinmunoensayo en fase sólida automatizado (Figura 17), siguiendo las recomendaciones del fabricante. En esta técnica los alérgenos testados (en el caso de IgEe e IgG4e) o una anti IgE (en el caso de la IgEt) se unieron covalentemente a un soporte polimérico de celulosa activado, denominado ImmunoCAP.

a) Procedimiento

Brevemente, el procedimiento para IgEt e IgEe fue el siguiente: los ImmunoCAP de DP (d1) se incubaron con el suero del paciente, de manera que las distintas Ig a determinar se unieron a su antígeno específico (en el caso de la

IV. Material y Métodos

IgEe) o IgEt (T-aIgE) y se formó un primer complejo. Después de un primer lavado en que las Ig no unidas se eliminaron, se añadió un anticuerpo (anti-IgE) marcado con una enzima (β -galactosidasa), formándose un complejo antígeno-IgE (total o específica)-anti-IgE+galactosidasa. Después de la incubación el exceso de enzima no unido se eliminó mediante otro lavado. El complejo final se incubó posteriormente con una solución de desarrollo que contiene el sustrato de la β -galactosidasa, dando lugar a un producto fluorescente. Finalmente, después de parar la reacción se midió la fluorescencia del fluido.



Figura 17. Sistema UniCAP 100

El procedimiento para la IgG4e fue similar al descrito previamente. Se comenzó por una dilución del suero del paciente 1/100, pues esta Ig se encuentra en mayor concentración en suero respecto a la IgE. Tras dicha dilución se incubó el ImmunoCAP de DP (d1) y posteriormente se lavó para retirar el exceso no unido. A continuación, se añadió la solución conjugada Anti-IgG4 con β -galactosidasa para que se una a los complejos de antígeno-IgG4 del paciente, y tras su incubación se añadió la solución de revelado que contiene el sustrato frente al enzima β -galactosidasa, se paró la reacción y se midió la fluorescencia del fluido.

b) Criterios de evaluación

Para evaluar los resultados, las unidades de fluorescencia se transformaron en concentraciones (kU/L) utilizando una curva de calibración

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

para la IgE. Se consideraron positivos los resultados > 0.35 kU/L, mientras que los valores superiores a 100 kU/L se consideraron muy elevados. Las unidades utilizadas para IgG4e fueron mg_A/L.

También se calculó la proporción IgG4e/IgEe, transformando ambas a la misma unidad (ng/L) (305). Se realizaron determinaciones a tiempo cero, y tras 1, 6 y 12 meses de iniciar el tratamiento con ITSC-DP en el grupo de tratados y a los mismos periodos en los no tratados.

2.2.3. Determinación de las células secretoras de IgG4 mediante ELISpot

Con este ensayo se determinan el número de células productoras de un anticuerpo (en nuestro caso de IgG4). Los resultados se presentan como número de puntos (spots), que corresponden cada uno a una célula productora del anticuerpo de interés.

Para su realización se añadieron 100 μ L de solución de Anti-Ig total (Ig H+L) (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) a 5 μ g/mL en una placa de ELISpot (Millipore, Darmstadt, Alemania) y se incubó durante toda la noche a 4°C. Se lavó 3 veces con tampón fosfato (PBS, del inglés “phosphate saline buffer”), se añadieron 200 μ L de tampón de bloqueo (Sigma) y se incubó 1 hora a 37°C, para bloquear las uniones inespecíficas. Se lavó la placa 4 veces con PBS y se añadieron 10⁵ células en medio RPMI 1640 + 2% de suero fetal bovino por pocillo en la primera columna, haciéndose hasta 6 diluciones seriadas 1:2. El último pocillo fue el blanco, por lo que no se añadieron células. Se incubaron durante 48 horas a 37°C con 5% CO₂.

Tras el cultivo, se lavaron las placas con H₂O- una vez para lisar las células y luego 3 veces más con la solución de lavado (PBS-Tween 20 0.05% v/v), dejando 10 minutos las placas con el tampón entre cada lavado. A continuación, se añadió el anticuerpo marcado con la enzima fosfatasa alcalina (anti-IgG4-AP) (Southern Biotech) diluido 1/2000 en la solución de lavado 2, se taparon las placas y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Tras la

incubación, se lavaron las placas tres veces con la solución de lavado 2, dejando reposar el tampón 10 minutos en la placa entre cada lavado. Seguidamente, se lavaron las placas dos veces con PBS, se añadieron 100 μ L por pocillo de sustrato NBT-BCIP (Sigma) y se incubaron en oscuridad durante 20 minutos. Después de la incubación se realizaron dos lavados con agua y se dejaron secar al aire. Finalmente, se contaron los puntos con ayuda de una lupa. Cada punto o *spot* corresponde a una célula productora de IgG4, por lo que, conociendo el número inicial de células en cultivo y la dilución correspondiente, se puede calcular el porcentaje de células productoras de IgG4.

2.2.4. Test de activación de basófilos (TAB) durante la ITSC-DP.

En este test, tras la incubación de las células con los alérgenos, se determina la activación de los basófilos mediante el análisis de la expresión de CD63, marcador específico de degranulación (306) (Figura 18).

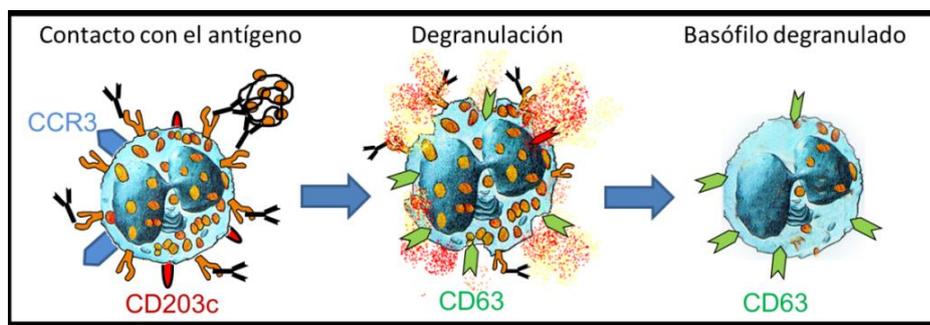


Figura 18. Degranulación del basófilo.

a) Procedimiento

Se añadieron 100 μ L de sangre completa heparinizada y 20 μ L de solución de estimulación + 1 μ L de anti-CCR3-APC (Biolegend) por muestra. La composición del tampón de estimulación es la siguiente: 1M de HEPES, 0,78% de NaCl, 0,037% de KCl, 0,078% CaCl₂, 0,033 MgCl₂, 0,1% HSA (p/v), y 10 μ g/ml de rhIL-3 (R&D system, Minneapolis MN, USA). Las muestras se incubaron durante 10 minutos en agitación a 37°C en un baño de agua y se añadieron 100 μ L de solución de lavado (PBS-Tween 20 0.05% v/v) al tubo de control negativo, 100 μ L de anti-IgE humana (Dako, Santa Clara, CA, USA) o

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

fMLP (Sigma) (0.5 mg/mL) a los tubos de control positivo y 100 μ L del alérgeno nDer p1 (Indoor Biotechnologies, Charlottesville, VA, USA) a diferentes concentraciones (10-0.1 μ g/mL). Estas concentraciones fueron elegidas mediante curvas dosis-respuesta y estudios de citotoxicidad. Las muestras fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C en agitación. La degranulación de los basófilos se detuvo mediante la incubación de las muestras a 4°C durante 5 minutos. Las células fueron marcadas con 1 μ L de cada anticuerpo monoclonal anti-CD203c-PE y CD63-FITC (Biolegend) para caracterizar los basófilos y su activación respectivamente incubando durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Se lisaron los glóbulos rojos añadiendo 2 mL de solución de lisis (BD Bioscience) e incubando 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 1500 rpm, decantando los sobrenadantes. Los precipitados obtenidos se lavaron con 3 mL de solución de lavado, se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm y se eliminaron los sobrenadantes por decantación.

Finalmente, las células fueron analizadas en un citómetro de flujo FACScalibur (BD Bioscience), adquiriéndose al menos 500 basófilos por muestra. Los resultados se analizaron mediante el programa CellQuest (BD Bioscience) seleccionando los basófilos como aquellas células que expresan CCR3⁺CD203c⁺ dentro de la nube de linfocitos. La activación se determinó mediante la expresión del marcador CD63⁺ (Figura 19).

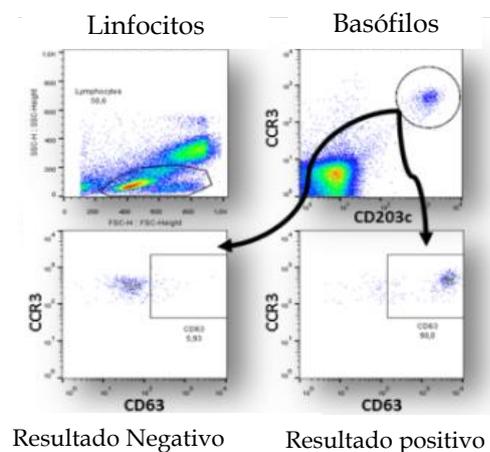


Figura 19. Estrategia del TAB por citometría.

b) Criterios de evaluación.

Los resultados fueron considerados positivos cuando el índice de estimulación (IE), calculado como la proporción entre el porcentaje de basófilos degranulados con el alérgeno y el porcentaje de basófilos degranulados en las muestras sin estímulo, fue superior a 2 en al menos una de las concentraciones del alérgeno.

$$IE = \frac{\%CD63 \text{ con alérgeno}}{\%CD63 \text{ sin estímulo}}$$

2.2.5. Estudio del fenotipo de subpoblaciones celulares durante la ITSC-DP

Se analizaron los cambios en la frecuencia de las diferentes subpoblaciones celulares de linfocitos T y B con el objetivo de obtener una visión global de los cambios inmunológicos producidos durante el año de administración de ITSC-DP.

a) Cultivo de PBMC

Las PBMC fueron descongeladas y cultivadas a una concentración de 10^5 células por pocillo en medio R10 (RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, gentamicina 50 mg/mL y suero fetal bovino al 10%) con nDer p1 a 10 μ g/mL durante 6 días a 37°C con 5% CO₂. Durante las 6 últimas horas de cultivo se añadió Brefeldin-A (10 μ g/mL) (Sigma) para detener el transporte vesicular del citoesqueleto y facilitar la detección de citoquinas intracelulares. Los sobrenadantes se recogieron y se almacenaron a -20°C para futuras determinaciones de producción de citoquinas.

b) Fenotipado celular

Tras su cultivo se recogieron las células y se fenotiparon las diferentes subpoblaciones usando los siguientes anticuerpos monoclonales para los linfocitos T (Tabla 3):

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

CD3-PE, CD3-FITC, CD4-APCH7, CD25-PECy7, CD127-PE, CD294-FITC, IFN γ -FITC, IL9-AF647 (BD™ Bioscience, San Jose, CA, USA), CD27-PerCPCy5, FoxP3-AF647, IL17a-PerCPCy5 (Biolegend, San Diego, CA, USA), ROR γ t (Ebioscience, San Diego, CA, USA) y el marcador de células muertas Live/Dead APCCy7 (Life Technologies, Eugene, OR, USA).

Población	Subpoblación	Nombre	Fenotipo
Células T	T efectoras	Th1	CD3 ⁺ CD4 ⁺ IFN γ ⁺
		Th2	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁻ CD294 ⁺
		Th9	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD294 ⁻ IL-9 ⁺
		Th17	CD3 ⁺ CD4 ⁺ ROR γ t ⁺ IL17a ⁺
	Células Treg	Treg	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD127 ⁻ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺
Células B	Células B	Células B	CD19 ⁺
		Células B DP-específicas	CD19 ⁺ DP1 ⁺
		Células B productoras de IgE	CD19 ⁺ IgE ⁺
		Células B DP-específicas productoras de IgE	CD19 ⁺ DP1 ⁺ IgE ⁺
	Células B memoria	Células B memoria	CD19 ⁺ CD27 ⁺
		Células B memoria DP-específicas	CD19 ⁺ CD27 ⁺ DP1 ⁺
		Células B memoria productoras de IgE	CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgE ⁺
		Células B memoria DP-específicas productoras de IgE	CD19 ⁺ CD27 ⁺ DP ⁺ IgE ⁺
	Células Breg	Células Breg	CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD38 ⁺ CD24 ⁺ IL-10 ⁺
	Plasmablastos	Plasmablastos	CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD38 ⁺ CD138 ⁺
	Células plasmáticas	Células plasmáticas totales	CD19 ⁺ CD20 ⁻ CD38 ⁺ CD138 ⁺
		Células plasmáticas de vida larga	CD19 ⁺ CD20 ⁻ CD38 ⁺ CD138 ⁺ CXCR4 ⁺
		Células plasmáticas inflamatorias	CD19 ⁺ CD20 ⁻ CD38 ⁺ CD138 ⁺ CXCR3 ⁺

Tabla 3. Subpoblaciones celulares estudiadas y monoclonales utilizados.

IV. Material y Métodos

Los anticuerpos monoclonales utilizados para el fenotipado de linfocitos B fueron: CD19-PECy7, CD24-PE, CD27-PerCPCy5, CD38-AF488, CD138-PerCPCy5, CXCR3-PE, CXCR4-APC, IL10-PECy7 (Biolegend), α DP-AF647, CD20-APCH7 (BD™ Bioscience), α IgE-PE (eBioscience) y el marcador de células muertas Live/Dead APCCy7 (Life Technologies).

Para la tinción de las diferentes subpoblaciones celulares se recogieron las células del cultivo mediante centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos. El precipitado celular resultante se resuspendió en 50 μ L de tampón de tinción (FACS FLOW, BD™ Biosciences), que contenía la mezcla de anticuerpos monoclonales específicos para los antígenos de superficie que se querían marcar, así como el marcador de células muertas, incubándose durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se lavó con tampón de tinción y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos.

A partir de este momento se siguieron dos protocolos diferentes:

I. Mediante el Kit CitoFix/Citoperm (BD™ Biosciences) para Th1, Th9, Th17 y linfocitos B reguladores.

El precipitado celular resultante se resuspendió en 100 μ L de la solución fijadora y permeabilizadora y se incubó a 4°C durante 20 minutos, para posteriormente lavar con 200 μ L de tampón Perm/Wash. Para la tinción de citoquinas intracelulares se añadieron 50 μ L de tampón Perm/Wash con la mezcla de anticuerpos intracelulares marcados con fluorocromos y se incubó durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente, se lavaron las células con el tampón Perm/Wash y se resuspendieron en tampón de tinción.

II. Mediante el Kit Human FoxP3 Buffer Set (BD™ Pharmingen) para las células Treg.

Se añadieron 200 μ L de tampón A al precipitado celular (preparado en el momento tras dilución 1:10 en agua destilada) y se mantuvo durante 10

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se centrifugó a 1630 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante mediante pipeteo, con cuidado de no eliminar las células. Se añadieron 200 μ L de tampón de lavado y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Seguidamente, se añadieron 50 μ L de tampón C (diluido 1:50 en el tampón A 1x preparado anteriormente) y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Se añadieron 200 μ L de tampón de tinción y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. A continuación, se añadió el anticuerpo frente a FoxP3, y se repitió el paso anterior incubando 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 200 μ L de tampón de tinción y se centrifugaron a 1500 rpm para eliminar el exceso de anticuerpo no unido.

Por último, las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) (Figura 20) y los resultados fueron analizados con el programa FlowJo® (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA), atendiendo a tres parámetros: tamaño (FSC) y granularidad celular (SSC), e intensidad de fluorescencia para cada uno de los fluorocromos utilizados. Para ello se realizó un primer análisis seleccionando los linfocitos en función de su tamaño y granularidad. Luego se seleccionaron las células vivas (aquellas no teñidas con el marcador de células muertas). A partir de esta población se analizaron los marcadores de las diferentes subpoblaciones linfocitarias.



Figura 20. Equipo de citometría FACS Canto II

2.2.6. Estudio de la expresión génica de factores de transcripción en PBMC en presencia del alérgeno.

a) Cultivo celular para la extracción de ARN

En este estudio se analizó la expresión de los genes *T-BET*, *GATA-3*, *FOXP3* y *ROR γ t*, específicos de subpoblaciones linfocitarias tanto en pacientes como en controles en células de muestras obtenidas a tiempo 0M y 12M. Para los estudios de expresión mediante la determinación de ARN mensajero (ARNm), se descongelaron las PBMC y se pusieron a una concentración de 10^6 células por pocillo en medio de cultivo R10 con nDer p 1 a $10\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 6 días a 37°C y 5% CO_2 . Pasado ese tiempo se recolectaron las células y se lavaron con PBS estéril, centrifugándose a 10000 rpm durante 5 minutos. Tras el lavado, se decantó el sobrenadante y se añadió 1 mL de medio RLT (Qiagen, Hilden, Alemania) y $10\mu\text{L}$ de β -mercaptoetanol, atendiendo a las instrucciones del fabricante. Se realizó un pipeteado vigoroso para asegurar la ruptura de las membranas celulares, formándose un lisado que se almacenó a -80°C hasta su posterior uso.

b) Extracción de ARN

Para la extracción de ARN total el lisado celular se descongeló a temperatura ambiente y se usó el sistema RNeasy Mini Kit (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos los tampones de reacción usados en este proceso fueron proporcionados por el kit.

Brevemente: una vez descongelados, se añadió a los $350\mu\text{L}$ de lisado el mismo volumen de etanol al 70%, y el total del volumen se transfirió a una columna sobre un tubo de 2 mL. Se centrifugó durante 15 segundos a 10000 rpm y se descartó el eluido, quedando el ARN retenido en la columna. Seguidamente se añadieron $350\mu\text{L}$ de tampón de lavado RW1 a la columna y se centrifugó durante 15 segundos a 10000 rpm, descartándose de nuevo el eluido. A continuación, se procedió a la degradación del ADN, añadiendo directamente

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

a la columna una mezcla compuesta por 10 μL de DNasa1 y 70 μL de RDD. Se incubó la muestra durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, se añadieron 350 μL de tampón de lavado RW1 y se centrifugó durante 15 segundos a 10000 rpm, descartando el eluido. Posteriormente se añadió a la columna 500 μL de tampón RPE para precipitar el ARN, se centrifugó durante 15 segundos a 10000 rpm y se descartó el eluido. Se lavó la columna con 500 μL de etanol al 80% y centrifugando durante 2 minutos a 10000 rpm, descartando de nuevo el eluido. Se eliminaron los restos de alcohol centrifugando la muestra en los tubos con los tapones abiertos durante 5 minutos a 10000 rpm. Por último, se procedió a la recuperación del ARN, para lo que se colocó la columna sobre un nuevo tubo eppendorf, y se añadieron directamente en el centro de la columna 14 μL de agua libre de RNasas. Se centrifugaron las muestras durante 1 minuto a 10000 rpm, recuperándose en este caso el eluido, que correspondía al ARN total extraído (Figura 21).

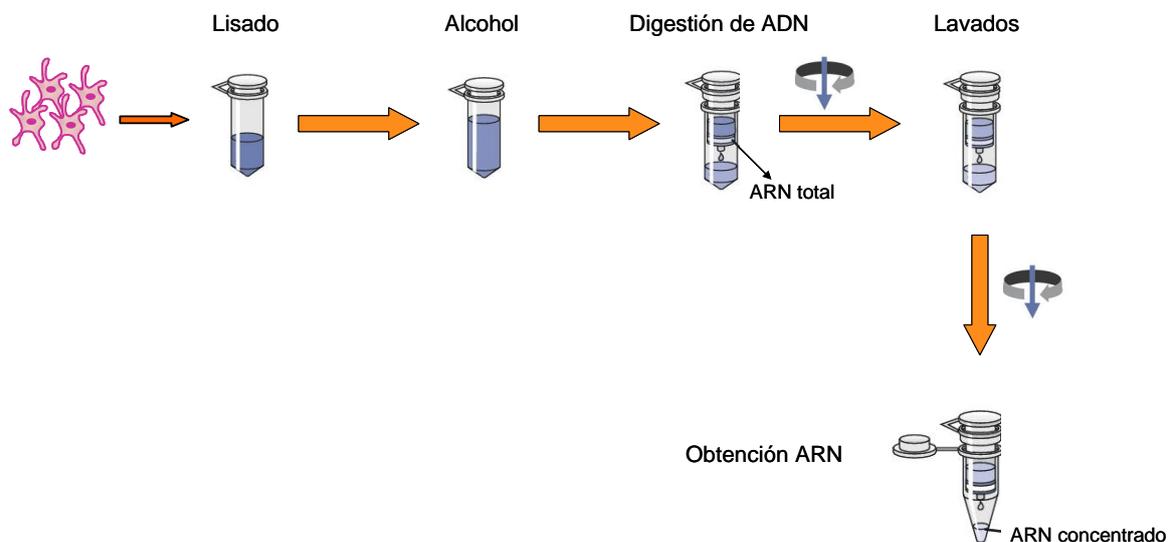


Figura 21. Esquema del proceso de extracción de ARN total a partir de PBMC (modificado de www.qiagen.com).

A continuación, se analizó la calidad y pureza de ARN mediante la determinación de absorbancias con el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Las muestras que no presentaron los siguientes parámetros de calidad fueron descartadas: A) relación de absorbancia 260/280

de 2,0; B) relación absorbancia 260/230 de entre 2,0 y 2,2. La integridad del RNA se determinó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2%.

c) Reversotranscripción del ARN

Tiene como objeto obtener ADN copia (ADNc) a partir del ARNm generado en las PBMC durante la estimulación, para estudiar la expresión de los factores de transcripción de interés. Para la reacción de reversotranscripción (RT) se mezclaron 0.5 μg del ARN extraído con 1 μL de OligodT (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Invitrogen), completándose hasta 11 μL con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), un agente inhibidor de RNAsas. Esta mezcla se incubó durante 10 minutos a 65°C para linealizar el ARN. A continuación se añadieron cada tubo de reacción 2 μL de la mezcla de dNTP (10 mM) (Invitrogen), 2 μL de tampón de reacción 10X RT (Sigma) y 0.25 μL de enzima Superscript II (Invitrogen, España), completando hasta un volumen final de 20 μL con agua DEPC. El programa de reversotranscripción fue el siguiente: 70 minutos a 37°C seguidos de 10 minutos a 85°C en un termociclador Veriti® 96 well (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). EL ADNc resultante se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

d) Diseño de los cebadores y PCR cuantitativa (qPCR)

El objetivo de esta técnica fue estimar los niveles de ARNm tras el cultivo de las PBMC con el estímulo para cada factor de transcripción estudiado, usando para ello los ADNc obtenidos en el paso anterior. Como gen de referencia se utilizó la β -actina. El diseño de los cebadores específicos para cada factor de transcripción y el gen de referencia se realizó utilizando el programa primer-BLAST (307) atendiendo a los siguientes criterios: longitud entre 18-22 nt, % GC entre el 40-60%, T_m 58-60°C y un tamaño del amplificado 80-150 nt (Tabla 4).

Para cada reacción de qPCR se mezclaron 5 μL de ADNc (0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) con 10 μL de la mezcla de cebadores correspondiente sentido y antisentido (10mM) y la solución SYBR Green PCR Master Mix Reagent (Applied Biosystems) hasta un volumen final de 25 μL . Las reacciones de PCR se llevaron

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

a cabo por duplicado. La PCR se realizó en el termociclador Light Cycler 480 (Roche, Mannheim, Alemania), utilizando el siguiente programa: 5 segundos a 95°C, seguidos de 1 minuto a 60°C durante 40 ciclos. Por último, se realizó un programa de fusión con una rampa de temperatura desde 60°C hasta 95°C. Durante este programa de fusión la adquisición de señal de fluorescencia se hizo de forma continua, mientras que durante los ciclos de amplificación la adquisición de señal se hizo puntualmente al final de cada ciclo.

El análisis de los resultados de la qPCR se realizó mediante el método propuesto por Pfaaffl (308), siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{gen problema}})^{\Delta CP_{\text{gen problema}}(\text{control-muestra})}}{(E_{\text{gen de referencia}})^{\Delta CP_{\text{gen de referencia}}(\text{control-muestra})}}$$

Donde:

E es la eficiencia de la qPCR: $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$

ΔCP es la desviación del gen (referencia o problema): $\Delta CP = \text{control} - \text{muestra}$

Gen	Secuencias de cebadores (5'-3')	
GATA-3	Sentido	AGAGCGAGCAACGCAATC
	Antisentido	GCAAAGAGAAGAAGGGGGAAGA
T-BET	Sentido	CCGTGACTGCCTACCAGAAT
	Antisentido	TAGTGATCTCCCCAAGGAA
FoxP3	Sentido	ACCTTCCCAAATCCCAGTG
	Antisentido	TGCTGCTCCAGAGACTGTACC
ROR γ t	Sentido	TAGTCCACGTTCCCATCAGC
	Antisentido	GGAAGTGGTGCTGGTTAGGA
β -actina	Sentido	GATGAGATTGGCATGGCTTT
	Antisentido	CACCTTCACCGTTCCAGTTT

Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de los genes estudiados.

e) Gel de agarosa

A partir de los amplificados obtenidos tras la RT-qPCR se procedió a la realización de un gel de agarosa. La finalidad fue comprobar que existía amplificación para cada pareja de cebadores, y que para cada gen se observaba una sola banda correspondiente a la secuencia diana, de forma que no se produjeran amplificaciones inespecíficas (Figura 22).

Para la realización de esta técnica se cargaron 10 μ L de muestra en un gel de agarosa al 2% peso/volumen, teñido con un agente intercalante (Gold View Nucleic Acid Stain, Genetech, San Francisco, CA, USA), junto con un marcador de peso molecular (DNA Molecular Weight Marker IX, Roche). EL gel se sometió a un campo eléctrico de 110V durante todo el proceso. Al finalizar la electroforesis, se reveló el gel aplicándole luz UV en un transiluminador ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA).

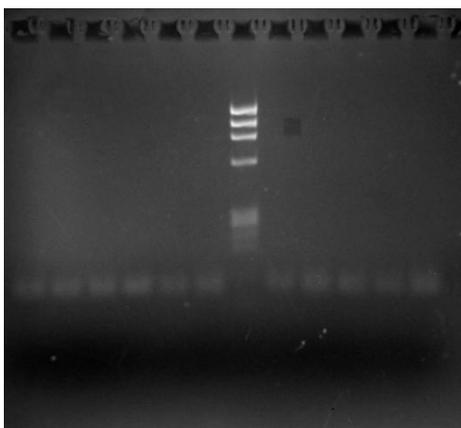


Figura 22. Imagen del gel de agarosa para comprobar la amplificación específica durante la PCR.

2.2.7. Determinación de la producción de citoquinas.

El objetivo de este análisis fue determinar el patrón de citoquinas producido en los cultivos celulares de PBMC estimulados con nDer p 1, de forma que pudiéramos estudiar la modulación de la respuesta inmunológica. Se analizaron las siguientes citoquinas: IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13 y TNF- α a partir de los sobrenadantes de cultivos recogidos anteriormente y almacenados a -20°C , con el kit comercial Th1/Th2/Th9/Th17/Th22

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

13plexFlowCytomix (eBioscience, San Diego, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Brevemente, la técnica es un inmunoensayo en la que se utilizan microesferas de diferente tamaño recubiertas por anticuerpos que reaccionan específicamente con cada una de las citoquinas detectadas por el kit. El resultado final fue la emisión de una señal fluorescente medida por citometría de flujo. Cada microesfera específica de cada citoquina presenta diferencias con las demás en su tamaño y espectro de emisión de fluorescencia. Finalmente, los datos se analizaron mediante el programa FlowCytomix Pro, obteniéndose la concentración de cada citoquina, expresada como pg/mL.

2.2.8. Separación inmunomagnética de subpoblaciones de células T (Tef y Treg)

Para estudiar el efecto de la ITSC-DP en las células Treg se comparó la actividad supresora de dichas células entre pacientes respondedores al tratamiento y pacientes no tratados. Para ello, se aislaron células Treg y Tef a partir de PBMC obtenidas en estado basal y a los 12 meses de ambos grupos de pacientes mediante el sistema de separación inmunomagnético EasySep™ Human CD4⁺CD127_{low}CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit (STEMCELL™ Technologies, Vancouver, Canada) (Figura 23), siguiendo las instrucciones del fabricante y en condiciones de esterilidad.



Figura 23. Imagen del imán utilizado para la separación celular inmunomagnética.

Brevemente, el kit marca las PBMC con anti-CD4 y anti-CD25 unido a partículas magnéticas. Al incubar en un campo magnético, se quedan adheridas a la superficie del tubo las células CD4⁺CD25⁺, decantándose las células no

marcadas. Posteriormente se siguen dos protocolos, según el tipo celular que vamos a aislar:

- a) Para el aislamiento de Treg: Se eliminan las partículas magnéticas anteriores y se añaden partículas magnéticas conjugadas con anti-CD127 y se incuban. De esta manera, se quedan adheridas a la pared del tubo las células CD127⁺ y las partículas magnéticas libres. En presencia del campo magnético se decantan las células, que son CD4⁺CD25⁺CD127⁻ (Treg)
- b) Para el aislamiento de Tef: Se eliminan las partículas magnéticas anteriores y se añaden otras que solo se unen a las células con marcaje anti-CD25. Se incuban en presencia del campo magnético y las células CD25⁺ se quedan adheridas a la pared del tubo. Finalmente, se decantan las células en presencia del campo magnético, que son CD4⁺CD25⁻ (Tef).

2.2.9. Cultivos celulares para analizar la funcionalidad de Treg

Las Tef obtenidas a 0M y 12M se co-cultivaron en una proporción 5:1 con Treg de 0M y 12M respectivamente y de forma cruzada, obtenidas del mismo paciente. Se cultivaron también Tef 0M y 12M en ausencia de Treg, a modo de control negativo. Se pusieron 10⁵ células por pocillo con medio R10 en presencia y ausencia de nDer p 1 (10 µg/mL) y se cultivaron durante 6 días a 37°C con 5% CO₂. En las dos últimas horas de cultivo se añadió 1 µL de GolgiStop (BD™ Biosciences) por mL de R10 al cultivo. Este compuesto inhibe el transporte de vesículas, favoreciendo la acumulación de éstas en el interior de las células, lo que es muy útil para la detección de citoquinas intracelulares.

2.2.10. Fenotipado celular de estudios funcionales de Treg

Tras el cultivo, se recogieron las células y se fenotiparon para determinar las siguientes poblaciones celulares recogidas en la Tabla 5.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

Los anticuerpos monoclonales utilizados para el fenotipado fueron los siguientes: CD3-PerCP, CD4-APC, CD4-APCH7, IL10-PE, IFN γ -PECy7, IL9-PE (BD™ Bioscience), CD27-PerCP, CD294-AF, IL4-PECy7 (Biolegend) y el marcador de células muertas Live/Dead APC Cy7 (Life Technologies).

Para la tinción de las diferentes subpoblaciones celulares, se realizó el procedimiento explicado anteriormente en el apartado 2.2.5.

Población	Subpoblación	Nombre	Fenotipo
Células T	T efectoras	Th1	CD3 ⁺ CD4 ⁺ IFN γ ⁺
		Th2	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁺ CD294 ⁺
		Th9	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD294 ⁺ IL-9 ⁺
	Células T productoras de citoquinas	Células T productoras de IL-10	CD3 ⁺ CD4 ⁺ IL-10 ⁺
		Células T productoras de IL-4	CD3 ⁺ CD4 ⁺ IL-4 ⁺
		Células T productoras de IL-9	CD3 ⁺ CD4 ⁺ IL-9 ⁺

Tabla 5. Subpoblaciones celulares estudiadas.

2.2.11. Estudio de la proliferación celular de linfocitos mediante el marcaje de CFSE

Tras la separación celular inmunomagnética, se pusieron en cultivo células Treg y células Tef, tal y como se describe anteriormente. Las células Tef fueron previamente marcadas con CFSE (5,6-carboxifluoresceína diacetato N-succinimidylester), un compuesto que emite en una longitud de onda de absorción similar a la del isotiocianato de fluoresceína, de acuerdo con la información proporcionada por el fabricante. Al entrar en contacto con la célula este marcador difunde hacia el citoplasma, y las esterasas intracelulares liberan grupos acetatos, quedando solo la molécula que posee el fluoróforo, de manera que las membranas celulares se vuelven impermeables a éste. Cuando una célula se divide por mitosis, cada célula hija llevará en su citoplasma la mitad de CFSE que la generación anterior, así en la determinación por citometría de flujo de células con cantidades menores de CFSE sugerirá la presencia de

IV. Material y Métodos

células que han proliferado a partir de un grupo inicial. Esta técnica permite detectar 8-10 generaciones celulares (Figura 24).

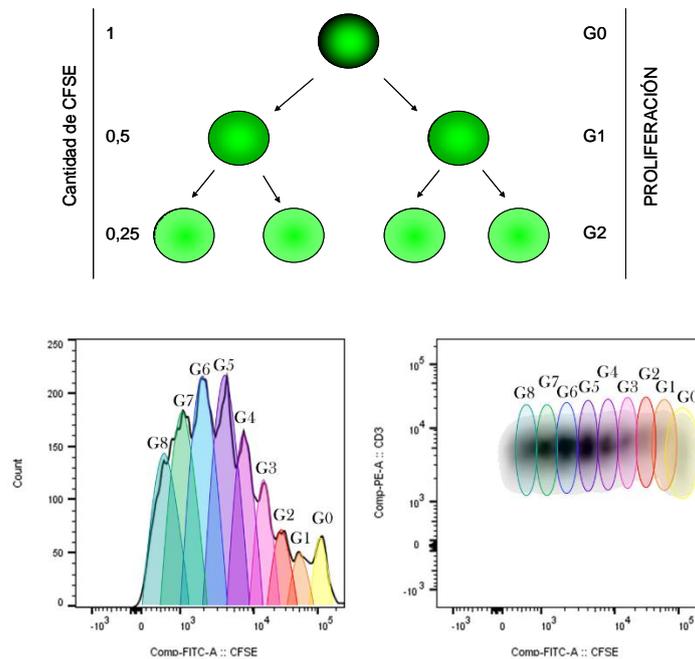


Figura 24. Mecanismo de acción del CFSE.

Las células Tef se resuspendieron en PBS, se les añadió CFSE 1 μ M y se incubaron durante 12 minutos. Seguidamente, se añadió medio R10 y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.

Finalmente, se pusieron en cultivo con las Treg tal y como se ha descrito en el apartado 2.2.5 y se incubaron durante 6 días a 37°C y 5% CO₂. Se cultivaron en presencia y ausencia de nDer p 1 a 10 μ g/mL y se usó como control positivo fitohemaglutinina (PHA) (Sigma) a una concentración de 10 μ g/mL. La proliferación de los diferentes subtipos celulares (Th1, Th2 y Th9) fue analizada por citometría de flujo como se describe en el apartado 2.2.5. Se obtuvo el porcentaje de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T, considerándose positivos aquellos resultados cuyo índice de proliferación (IP) fue mayor a 2, que se calculó como:

$$IP = \frac{\%CFSE \text{ cultivo con nDer p 1}}{\%CFSE \text{ cultivo sin estímulo}}$$

2.2.12. Determinación del mecanismo de supresión de las Treg

Este estudio se realizó mediante el análisis del efecto de los anticuerpos bloqueantes α -IL-10 humana (anti-IgG_{2B} de ratón) y α -TGF- β 1 humana (anti-IgG₁ de ratón) (R&D Systems) a 10 μ g/mL en los cultivos celulares de Tef y Treg marcados con CFSE descritos anteriormente.

Ambos anticuerpos bloqueantes se añadieron de forma individual y conjuntamente a todas las combinaciones de Tef y Treg. Éstas se cultivaron en medio R10 durante 6 días a 37°C y 5% CO₂, en presencia de nDer p 1 a 10 μ g/mL. La proliferación de los diferentes subtipos celulares (Th1, Th2 y Th9) fue analizada como se describió anteriormente y comparada con los cultivos sin presencia de anticuerpos bloqueantes.

2.3. Análisis estadístico

Para las variables cualitativas los resultados se compararon usando el análisis Chi-cuadrado (X^2) y el test de Fisher. Las comparaciones de las variables cuantitativas no relacionadas se realizaron con los tests de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney, mientras que las muestras relacionadas fueron analizadas con el test de Friedman y Wilcoxon. En todos los casos se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando los valores de p fueron menores o iguales de 0.05. Tras estos análisis, y para aquellas comparaciones que incluían más de dos variables, se aplicó la corrección de Bonferroni.

V. Resultados



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Características y respuesta clínica de los pacientes.

En el estudio se incluyeron 34 pacientes alérgicos a DP tratados con ITSC-DP, siendo el 41.2% de ellos mujeres y con una mediana de edad de 29 años (rango intercuartílico (RI): 21-33). De igual modo, se evaluaron 14 pacientes con RA no tratados (NT), 42.8% de ellos mujeres y con una mediana de edad de 26 años (RI: 19-31). Todos los casos presentaban un diagnóstico confirmado de alergia monosensible a DP, tras un estudio alergológico completo mediante historia clínica detallada, pruebas cutáneas, IgEe y TPN positivas a DP.

Se midió la eficacia de la ITSC-DP según los cambios clínicos producidos en la puntuación de síntomas de rinoconjuntivitis (PSR), puntuación de medicación utilizada (PMU), tamaño de púpula producida por la prueba intradérmica y cambios en la concentración de alérgeno a la cual es positivo el TPN. Tras un año de seguimiento, los pacientes tratados se clasificaron en RP, basado en una disminución de las puntuaciones de rinoconjuntivitis y medicación mayor de un 20%, y NR cuando no se produjeron estos cambios clínicos. En este estudio se observó una eficacia del 82% en la ITSC-DP. En ningún caso los pacientes tratados presentaron efectos adversos. Respecto al tiempo de evolución de la enfermedad, se pudo observar que los pacientes RP presentaron un menor tiempo de evolución de la enfermedad, con una mediana de 36 meses (RI: 24-120) que los pacientes NR, con una mediana de 180 meses (RI: 180-240). Los pacientes NT presentaron un tiempo de evolución intermedio respecto a los dos grupos de pacientes tratados, con una mediana de 60 meses (RI: 24-120).

Los cambios en las características clínicas se recogen en la Tabla 6. Observamos una reducción significativa de PSR ($p=0.002$) en RP. Respecto a las pruebas cutáneas intradérmicas, se registró una reducción significativa del área tanto en el conjunto de pacientes tratados (RP + NR), fundamentalmente debida a los pacientes RP ($p=0.022$ y $p=0.007$, respectivamente). También se observó una reducción significativa en la concentración de DP necesaria para la

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

obtención de una respuesta positiva en el TPN en NR indicando un empeoramiento de estos pacientes. Finalmente, se apreció un descenso no significativo en el PMU en RP.

	Basal	1mes	3 meses	6 meses	12 meses	p
Pacientes tratados con IT n=34						
PSR	2.78 (1.35-4.95)	3.57 (0.57-4.39)	4.46 (0.95-5.66)	2.8 (1.55-7.98)	2.21 (1.32-9.43)	0.255
PMU	0.25 (0.07-2.92)	0 (0-0.52)	0.25 (0.12-1.41)	0.30 (0.17-2.08)	0.67 (0.07-1.21)	0.220
Área del test intradérmico con DP (mm ²)	147 (90-176)	147 (120-238)	150 (81-256)	162.5 (120-192)	100 (88.5-148)	0.022
Concentración de TPN positivo (mg/ <u>mL</u>)	0.04 (0.04-4)	0.4 (0.04-4)	0.4 (0.04-4)	0.04 (0.04-4)	0.04 (0.04-4)	0.153
Respondedores a la IT n=28						
PSR	2.17 (1.35-2.92)	2.10 (0.57-4.33)	1.57 (0.95-4.55)	2.80 (1.55-4.15)	1.56 (1.32-2.85)	0.002
PMU	0.54 (0.07-1.20)	0.03 (0-0.52)	0.67 (0.19-1.41)	0.30 (1.17-2.08)	0.25 (0.07-1.21)	0.065
Área del test intradérmico con DP (mm ²)	149 (90-168)	138 (120-154)	150 (101-194.25)	169 (144-180)	100 (88.5-148)	0.007
Concentración de TPN positivo (mg/ <u>mL</u>)	0.004 (0.004-4)	0.4 (0.04-4)	0.4 (0.04-4)	0.4 (0.04-4)	0.4 (0.04-4)	0.389
No respondedores a la IT n=6						
PSR	3.85 (1.58-4.95)	3.98 (3.57-4.39)	4.46 (3.26-5.66)	6.78 (4.98-7.98)	8.32 (6.52-9.43)	0.063
PMU	0.25 (0.12-0.42)	0.17 (0.12-0.22)	0.3 (0.12-0.43)	0.54 (0.32-0.67)	0.67 (0.57-0.88)	0.458
Área del test intradérmico con DP (mm ²)	172 (168-176)	82 (120-238)	168.5 (81-256)	121 (120-192)	109.5 (99-120)	0.245
Concentración de TPN positivo (mg/ <u>mL</u>)	0.04 (0.04-4)	4 (0.04-4)	4 (0.4-4)	0.04 (0.04-0.04)	0.04 (0.04-0.04)	0.002
Grupo de no tratados con IT n=14						
PSR	4.75 (1.46-5.89)	4.56 (1.23-5.78)	4.05 (0.92-5.75)	0.67 (0.42-0.78)	5.53 (0.92-7.60)	0.122
PMU	0.07 (0-0.41)	0.12 (0-0.38)	0.16 (0-0.74)	0.26 (0-0.85)	0.46 (0-2.03)	0.458
Área del test intradérmico con DP (mm ²)	132 (118.25-89)	145 (126-210)	168 (120-323)	165 (87.75-334.5)	143 (83.5-191.25)	0.669
Concentración de TPN positivo (mg/ <u>mL</u>)	0.4 (0.04-0.4)	0.4 (0.04-0.4)	0.04 (0.04-4)	0.4 (0.04-4)	0.04 (0.04-0.04)	0.040

Tabla 6. Resultados clínicos durante la IT de los pacientes del estudio (media y rangos intercuartílicos). La p representa la significación de la comparativa entre los valores basales y de 12 meses.

2. Determinación de los niveles de inmunoglobulinas durante la ITSC-DP

Se estudiaron los cambios humorales producidos durante el tratamiento con ITSC-DP a tiempo inicial (0M), 1 mes (1M), 3 meses (3M), 6 meses (6M) y 12 meses (12M) a través de la determinación de IgEt y de IgEe e IgG4e y se calculó la relación IgEe/IgG4e. Se analizaron los datos obtenidos en relación a los RP,

NR, así como los NT, sin encontrar diferencias a nivel basal entre los grupos analizados.

2.1. Cambios en los niveles de inmunoglobulinas séricas estudiadas durante la ITSC-DP

Respecto a los niveles basales de IgEt, se observó una reducción significativa a partir de los 6M y 12M ($p=0.031$ y $p=0.031$) en NT. En el caso de los RP, se apreció un incremento significativo en el primer mes, que se mantuvo en el tercer mes ($p=0.022$ y $p=0.048$), seguido de un descenso. No se observaron diferencias en el caso de los NR (Figura 25).

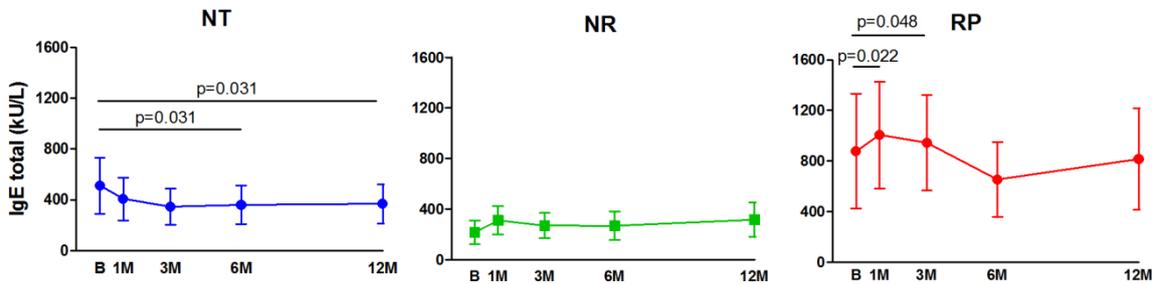


Figura 25. Niveles de IgEt (media y desviación estándar) durante 12 meses en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

Comparando con niveles basales de IgEe, se apreció un aumento significativo en 1M y 3M de seguimiento ($p=0.01$, $p=0.013$, respectivamente), continuando con un descenso progresivo hasta valores basales a los 12M en RP. No se encontraron diferencias significativas en los grupos en NR y NT (Figura 26).

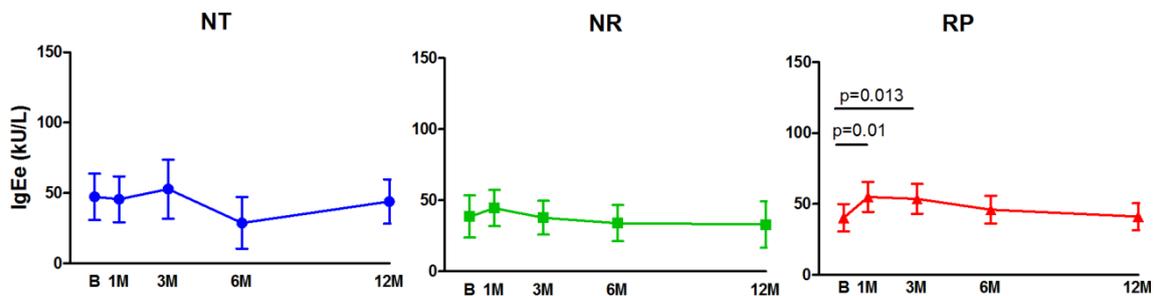


Figura 26. Niveles de IgEe (media y desviación estándar) durante 12 meses en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

De forma paralela se produjo un incremento en los niveles de IgG4e, solo observado en el grupo de RP. Dicho incremento fue significativo al mes ($p=0.006$), y se mantuvo a los 3M ($p=0.005$), 6M ($p=0.0017$) y 12M ($p=0.0002$) tras el inicio de la ITSC-DP respecto de los valores basales (Figura 27).

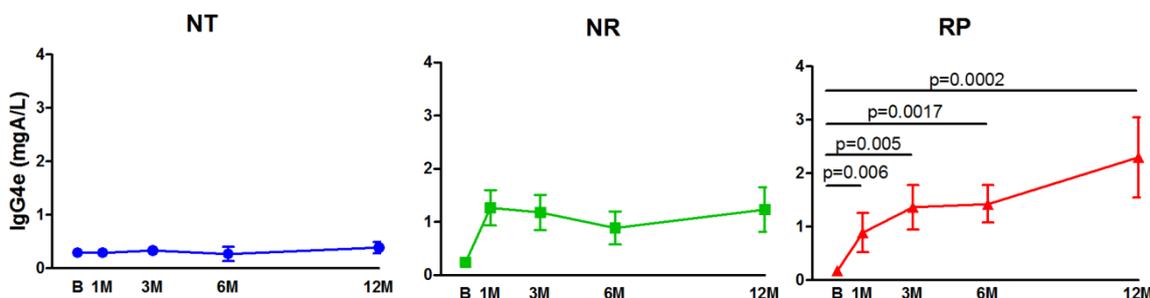


Figura 27. Niveles de IgG4 (media y desviación estándar) durante 12 meses en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

También se calculó la proporción IgEe/IgG4e, y se detectó una reducción significativa sólo en RP a partir de 1M ($p=0.013$), que se mantuvo a los 3M ($p=0.006$), 6M ($p=0.0005$) y 12M ($p=0.0005$) tras el inicio de la ITSC-DP comparado con los niveles basales (Figura 28).

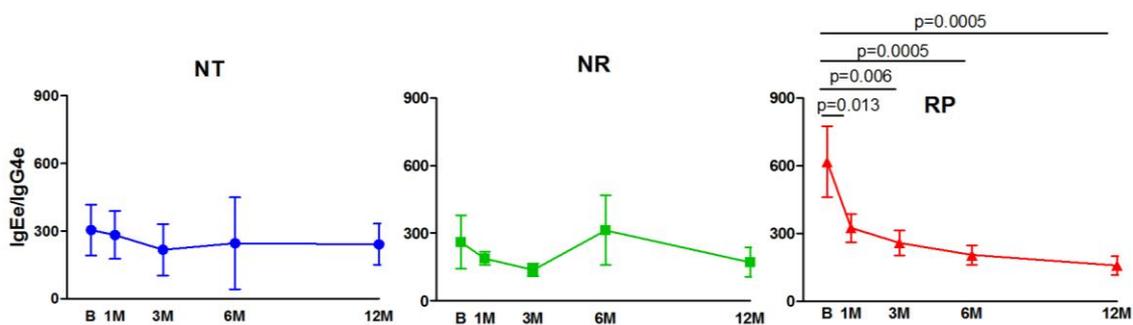


Figura 28. Cociente IgEe/IgG4 (media y desviación estándar) durante 12 meses en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

2.2. Determinación del nivel de células productoras de IgG4 mediante ELISpot

El análisis del número basal de células productoras de IgG4 total (IgG4t) demostró que no había cambios significativos entre los diferentes grupos incluidos en el estudio, NT, RP y NR. La comparación de los datos obtenidos

V. Resultados

durante los 12 meses de tratamiento respecto a los niveles basales, demostró la existencia de un incremento significativo a partir de los 3M ($p=0.034$) continuándose durante los 6M ($p=0.034$) y 12M ($p=0.035$) de tratamiento en el grupo de RP. No se observaron modificaciones en los niveles tanto en el grupo NT como en NR (Figura 29, A).

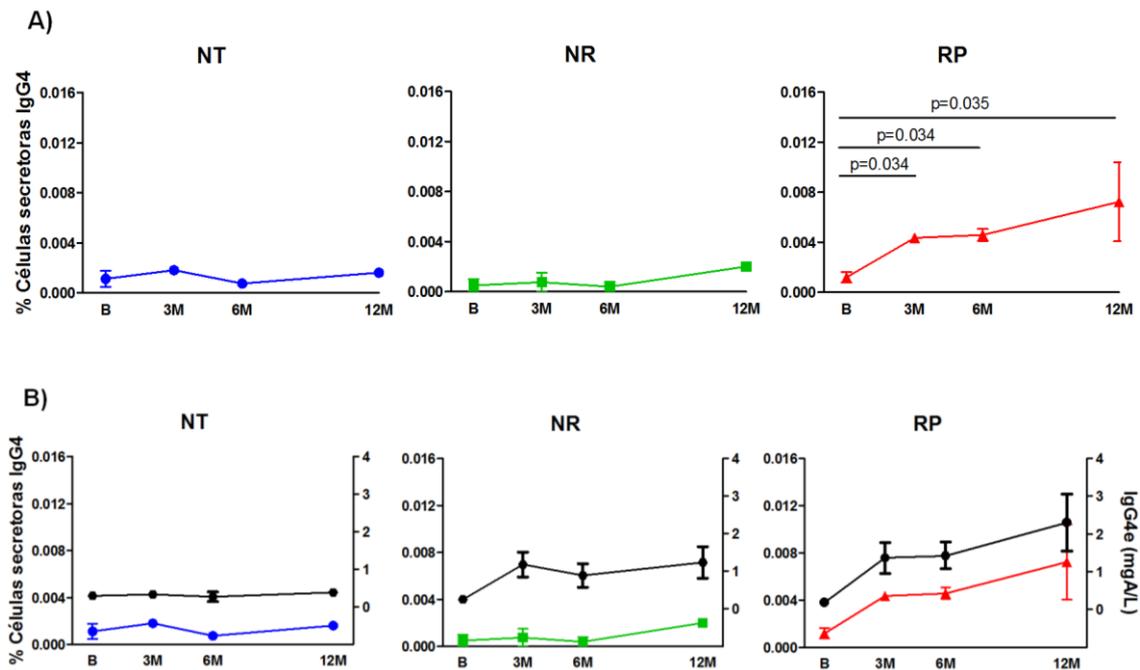


Figura 29. Porcentaje de células secretoras (media y desviación estándar) de IgG4 (A) y comparativa entre el porcentaje de células secretoras de IgG4t (rojo, verde y azul) y los niveles séricos de IgG4e (negro) (B) en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP. Las comparaciones de la evolución de las células productoras de IgG4t y los niveles séricos de IgG4e mostraron un incremento paralelo a lo largo de la ITSC-DP solo en el caso del grupo de RP (Figura 29, B).

3. Cambios celulares durante la ITSC-DP: en la reactividad del basófilo y en las diferentes subpoblaciones de células T y B.

Se estudiaron los cambios en la reactividad del basófilo frente a DP en todos los pacientes tratados y no tratados, así como los cambios en las características fenotípicas en las distintas subpoblaciones de linfocitos T (Th1, Th2, Th9, Th17 y Treg) y B (linfocitos B, linfocitos B memoria, linfocitos B reguladores, plasmablastos y células plasmáticas). Por último, se realizaron

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

estudios funcionales del efecto de la ITSC-DP sobre la actividad de las células Treg sobre las Tef, así como un análisis de la proliferación específica de dichas células ante nDer p 1 en pacientes con buena respuesta a la IT (RP) y en pacientes no tratados (NT).

3.1. Perfil de reactividad del basófilo mediante el test de activación de basófilos.

3.1.1. Análisis de la concentración óptima mediante curvas dosis-respuesta

La concentración para el alérgeno fue elegida mediante curvas de dosis-respuesta (10-0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en 5 pacientes alérgicos a DP y en 5 no sensibilizados y no alérgicos. Aquellos sujetos que mostraron resultados de TAB negativos cuando se estimularon con anti-IgE o fMLP fueron considerados no respondedores y por tanto descartados para el estudio de reactividad de basófilos. También fueron descartados aquellos casos que mostraron un porcentaje de activación basal menor al 5% y mayor al 10%.

3.1.2. Análisis de los cambios de la reactividad del basófilo

La comparación de la activación del basófilo durante un periodo de un año no arrojó diferencias entre los diferentes grupos de pacientes (NT, RP, NR) a ninguna de las concentraciones estudiadas. Tampoco se observaron diferencias significativas en la reactividad de los basófilos a nivel basal entre los grupos de pacientes estudiados (Figura 30).

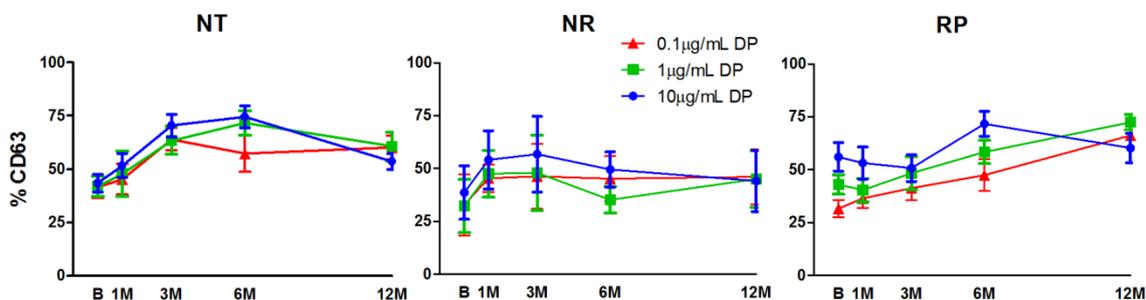


Figura 30. Reactividad de los basófilos (media y desviación estándar) a lo largo de los 12 meses de evolución en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

3.2. Cambios en las subpoblaciones celulares de linfocitos T (efectores y reguladores) tras un año de ITSC-DP

Se analizaron las diferentes subpoblaciones linfocitarias, tanto efectoras (Th1, Th2 y Th9) como reguladoras (Treg). El fenotipo celular a estudiar se describe en la Tabla 3.

3.2.1. Análisis de cambios en la frecuencia de subpoblaciones de linfocitos T específicas frente a Der p 1 durante ITSC-DP

Para ello se pusieron en cultivo las PBMC obtenidas a los 0M y 12M en presencia del alérgeno nDer p 1, y tras 6 días de cultivo se analizaron las frecuencias de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T mediante citometría de flujo (Figura 31).

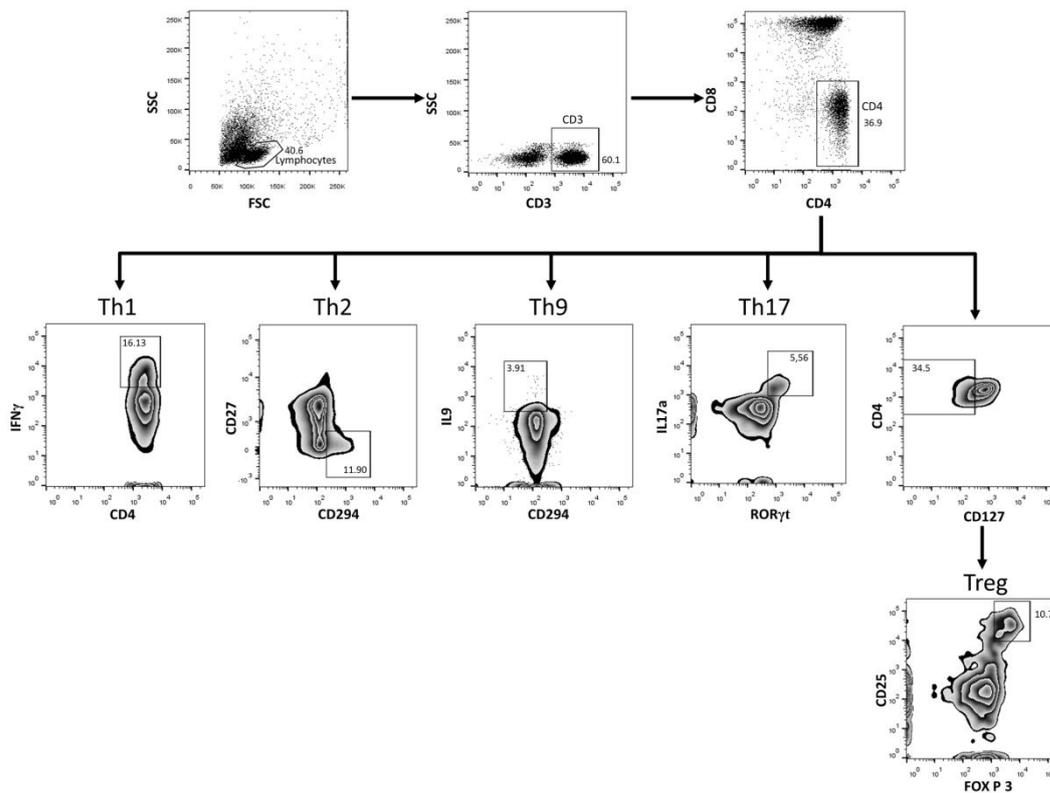


Figura 31. Estrategia de selección de las subpoblaciones Th1, Th2, Th9, Th17 y Treg mediante citometría de flujo.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

A nivel basal se observó un porcentaje de células Th1 significativamente menor en RP comparado con NT y NR ($p=0.023$ para ambos) y una menor frecuencia de Treg en pacientes NR comparado con los NT ($p=0.004$) (Figura 32).

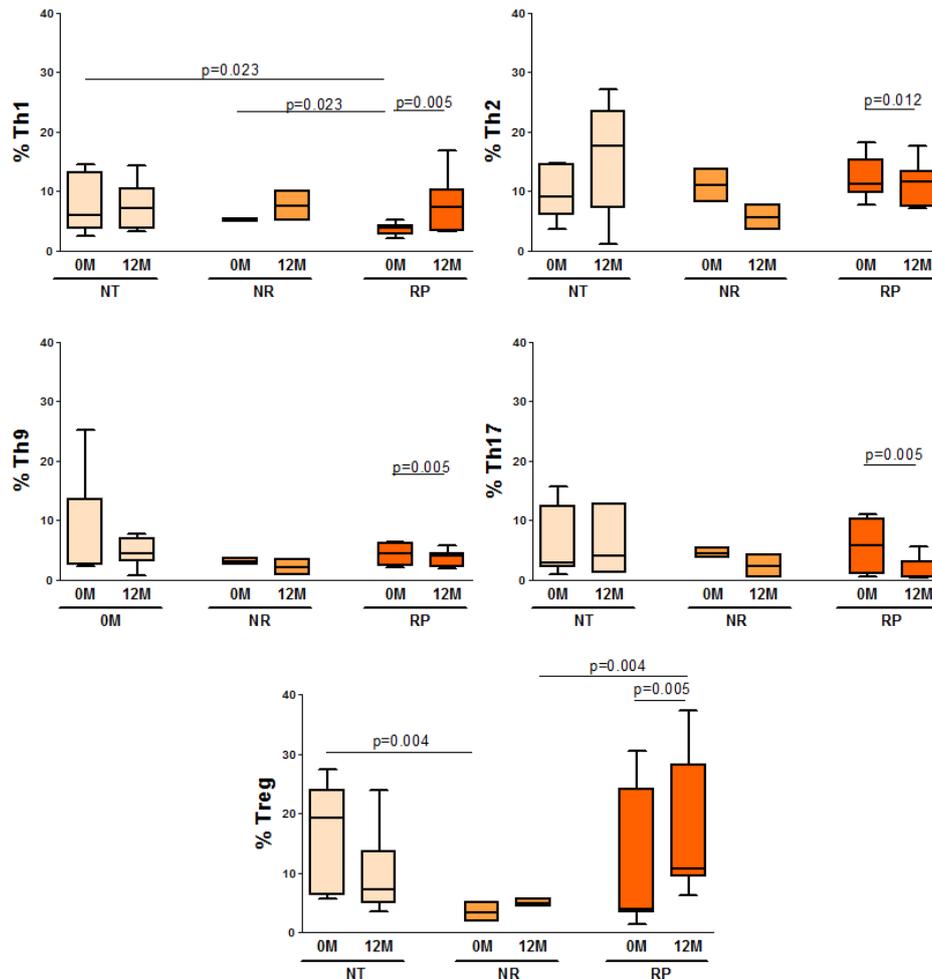


Figura 32. Subpoblaciones celulares en estado basal y tras 12 meses en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP (mediana y rango intercuartílico).

Posteriormente se analizaron las diferencias en porcentaje de las diferentes subpoblaciones de células T a lo largo de 1 año, comparando los resultados obtenidos en estado basal y tras 12 meses. Los datos mostraron cambios solamente en el grupo de RP a la ITSC-DP, con una disminución significativa de las subpoblaciones efectoras, Th2, Th9 y Th17 ($p=0.012$, $p=0.005$ y $p=0.005$, respectivamente). En contraposición, se observó un incremento

significativo en la frecuencia de las subpoblaciones Th1 y Treg ($p=0.005$ en ambos casos) (Figura 32).

3.2.2. Análisis de la expresión génica de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T.

Se estudió la expresión génica de factores de transcripción específicos de Th1, Th2, Th17 y Treg inducida por Der p 1. Para ello se pusieron en cultivo las PBMC obtenidas a los 0M y 12M en presencia del alérgeno nDer p 1, y tras 6 días de cultivo se analizó la expresión de ARNm de los genes *T-BET*, *GATA3*, *ROR γ t* y *FOXP3* mediante reversotranscripción y qPCR.

Los resultados mostraron incrementos significativos en la expresión de *T-BET* y *FOXP3* ($p=0.002$ y $p=0.023$, respectivamente), mientras que se produjo un descenso en la expresión de *GATA3* ($p=0.012$) y *ROR γ t* en RP a los 12 meses de tratamiento. Finalmente, se observó un incremento significativo de *GATA3* ($p=0.012$) en NT a los 12 meses (Figura 33).

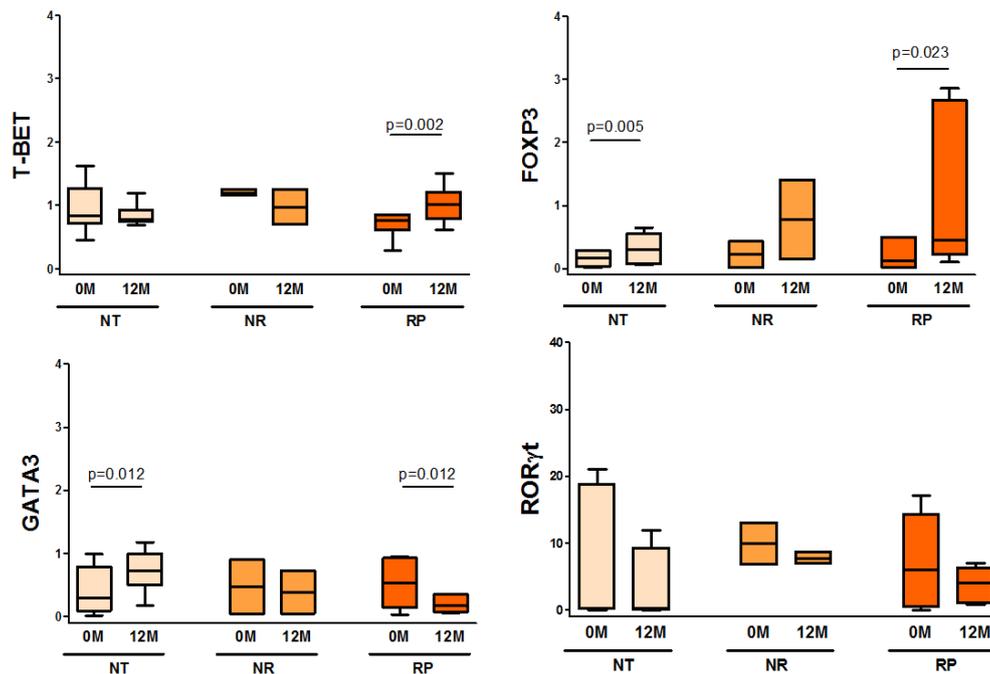


Figura 33. Niveles de expresión de los factores de transcripción específicos estudiados en estado basal y tras 12 meses en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP (mediana y rango intercuartílico).

3.2.3. Determinación de la producción de citoquinas

Se estudió la producción de citoquinas en los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de PBMC estimulados con nDer p 1.

En estado basal se detectó una producción significativamente mayor de IL-5 en RP respecto a la de NT y NR ($p=0.007$ y $p=0.004$, respectivamente), y de IL-9 en RP comparado con NT ($p=0.049$) (Figura 34).

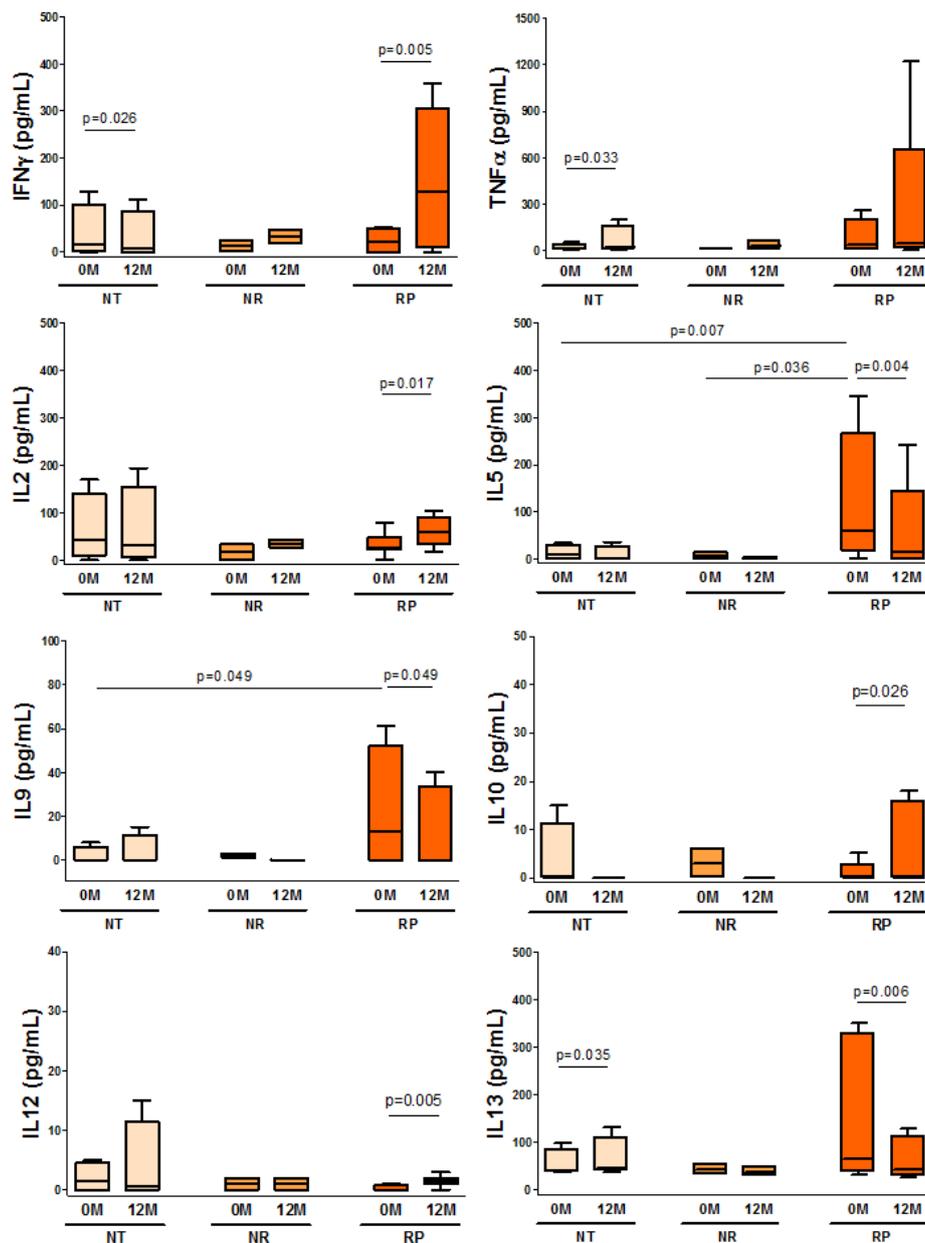


Figura 34. Producción de citoquinas en estado basal y tras 12 meses en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP (mediana y rango intercuartílico).

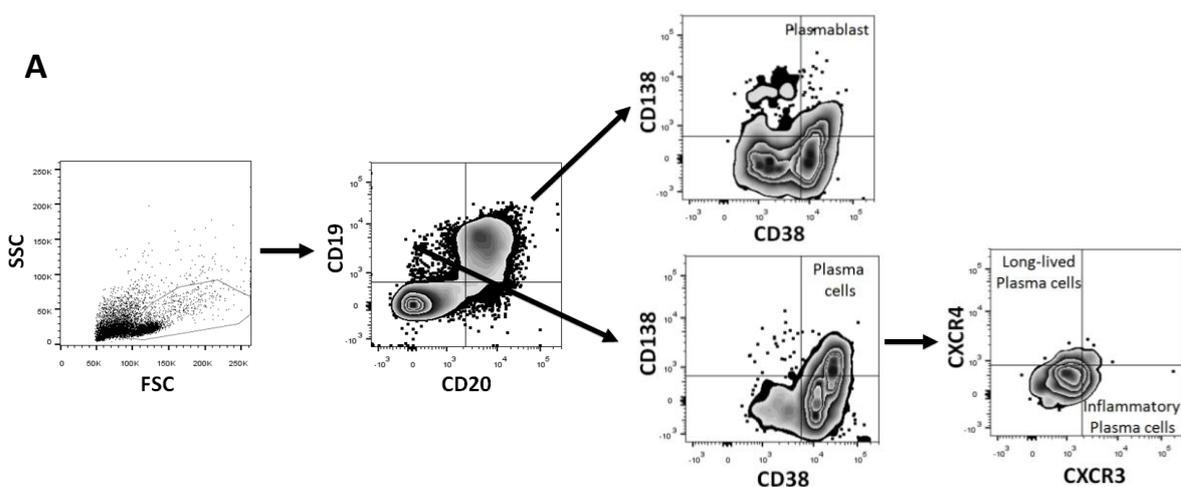
V. Resultados

Tras el año de seguimiento se observó un incremento de las citoquinas anti-inflamatorias $\text{IFN}\gamma$, IL-2, IL-10, IL-12 ($p=0.005$, $p=0.017$, $p=0.028$ y $p=0.005$, respectivamente) y un aumento (no significativo) del $\text{TNF-}\alpha$ en RP. Por el contrario, se apreció una reducción significativa en los niveles de IL-5, IL-9 e IL-13 ($p=0.004$, $p=0.049$ y $p=0.008$ respectivamente) tras 12 meses de ITSC-DP en RP. Se pudo detectar también un incremento significativo en los niveles de $\text{TNF}\alpha$ ($p=0.033$) y de IL-13 ($p=0.035$) en NT (Figura 34).

3.3. Cambios en las subpoblaciones celulares de linfocitos B durante un año de ITSC-DP

3.3.1. Análisis de cambios en la frecuencia de subpoblaciones de linfocitos B durante ITSC-DP

Se analizaron los cambios en las distintas subpoblaciones linfocitarias B (linfocitos B, B DP-específicos, B productores de IgE, B DP-específicos productores de IgE, B memoria, B memoria DP-específicos, B memoria productores de IgE, B memoria DP-específicos productores de IgE, B reguladores, plasmablastos, células plasmáticas, CPVL y CPI) en los diferentes grupos, tratados con ITSC-DP tanto RP como NR y NT a lo largo de un año, siguiendo la estrategia que se muestra en la Figura 35.



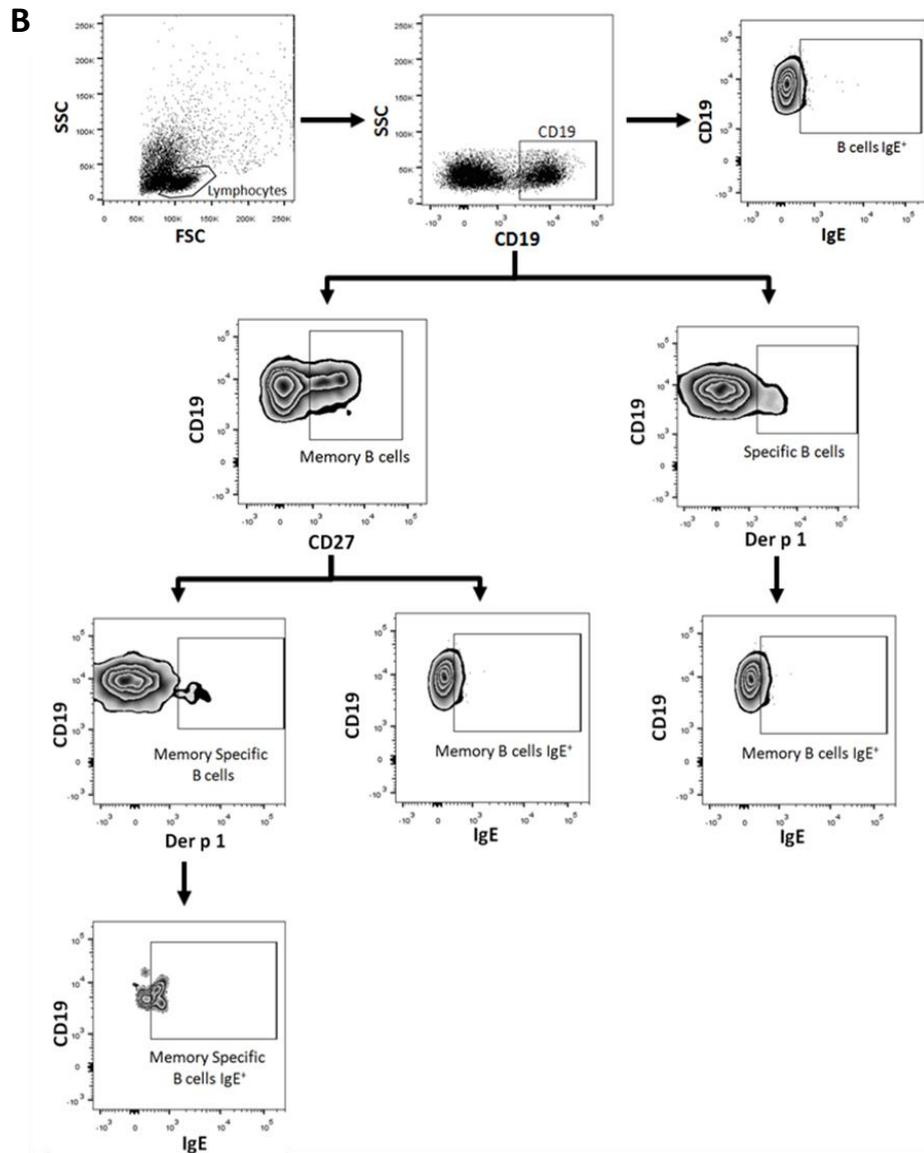


Figura 35. Estrategia de selección de las subpoblaciones de células plasmáticas (CD19⁺CD20⁺CD138⁺CD38⁺), plasmablastos (CD19⁺CD20⁺CD138⁺CD38⁺) CPVL (CD19⁺CD20⁺CD138⁺CD38⁺CXCR4⁺CXCR3⁻), CPI (CD19⁺CD20⁺CD138⁺CD38⁺CXCR4⁻CXCR3⁺) (A), linfocitos B (CD19⁺), B específicos a DP (CD19⁺Der p 1⁺), B productores de IgE (CD19⁺IgE⁺), B específicos a DP productores de IgE (CD19⁺Der p 1⁺IgE⁺), B memoria (CD19⁺CD27⁺), B memoria específicos a DP (CD19⁺CD27⁺Der p 1⁺), B memoria productores de IgE y B memoria específicos a DP productores de IgE (CD19⁺CD27⁺Der p 1⁺IgE⁺) (B) mediante citometría de flujo.

V. Resultados

A nivel basal, se observó un mayor porcentaje de linfocitos B memoria en RP comparado con NR ($p=0.003$), que se mantuvo durante todo el año de seguimiento ($p=0.006$, $p=0.03$, $p=0.037$ y $p=0.006$ a 1M, 3M, 6M y 12M, respectivamente) (Figura 36).

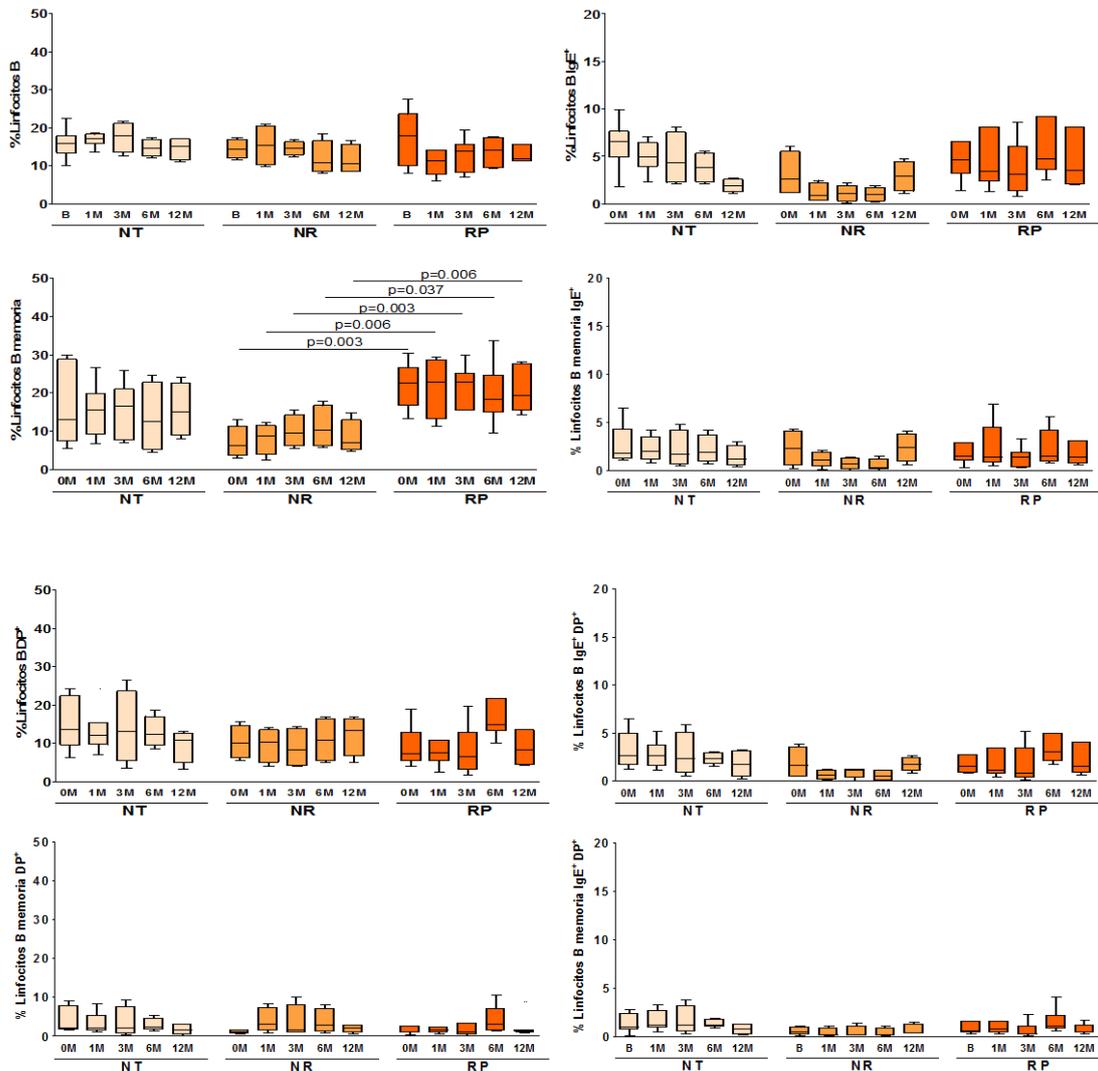


Figura 36. Porcentaje de subpoblaciones celulares de linfocitos B durante un seguimiento de 12 meses en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP (mediana y rango intercuartílico).

Los plasmablastos sufrieron una disminución significativa en 3M respecto a los niveles basales ($p=0.009$) en RP. De la misma manera, se produjo un descenso en el porcentaje de células plasmáticas comparado con los niveles

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

basales, siendo significativo a los 3M y 12M ($p=0.007$, $p=0.002$) en RP (Figura 37).

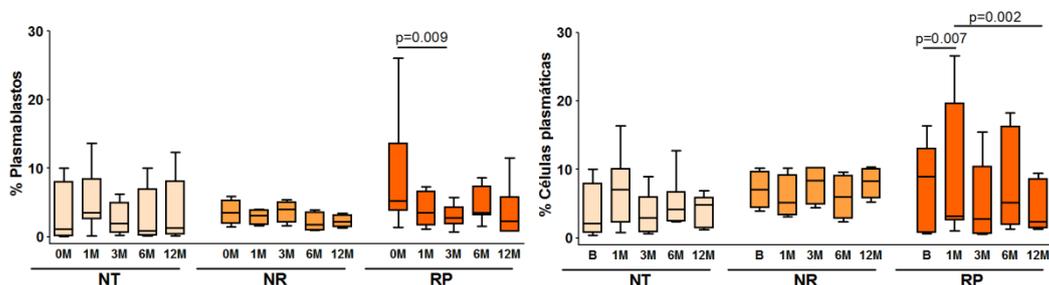


Figura 37. Porcentaje de plasmablastos y células plasmáticas durante un seguimiento de 12 meses en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP (mediana y rango intercuartílico).

Dentro de las células plasmáticas analizamos CPVL y las CPI. En el caso de las CPVL, se produjo un incremento a lo largo del estudio, siendo significativo sólo al mes del inicio del tratamiento ($p=0.012$) en RP. Por otro lado, el porcentaje de las CPI sufrió un descenso a lo largo de todo el periodo considerado, siendo significativo a partir de los 6M y 12M ($p=0.005$ en ambos) de tratamiento en RP. No se observaron diferencias en NR ni en NT (Figura 38).

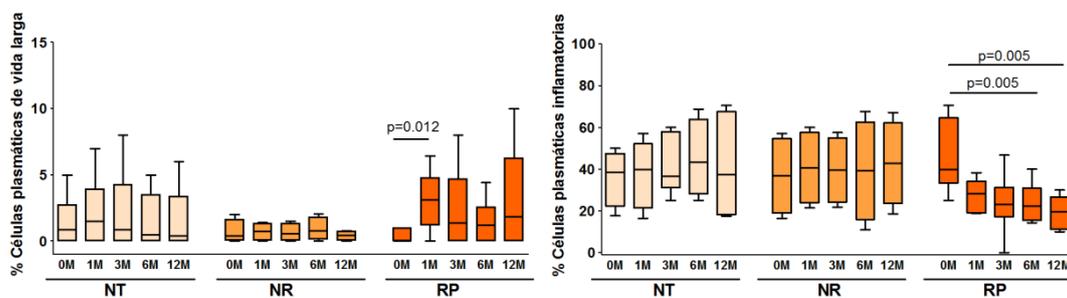


Figura 38. Porcentaje de células plasmáticas de vida larga y células plasmáticas inflamatorias durante un seguimiento de 12 meses en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP (mediana y rango intercuartílico).

La comparación de la evolución de las células plasmáticas, las CPI y las células secretoras de IgG4 indicó un incremento paralelo entre células plasmáticas y células secretoras de IgG4, a la vez que de forma inversa se

produjo una reducción en las células plasmáticas inflamatorias en RP (Figura 39).

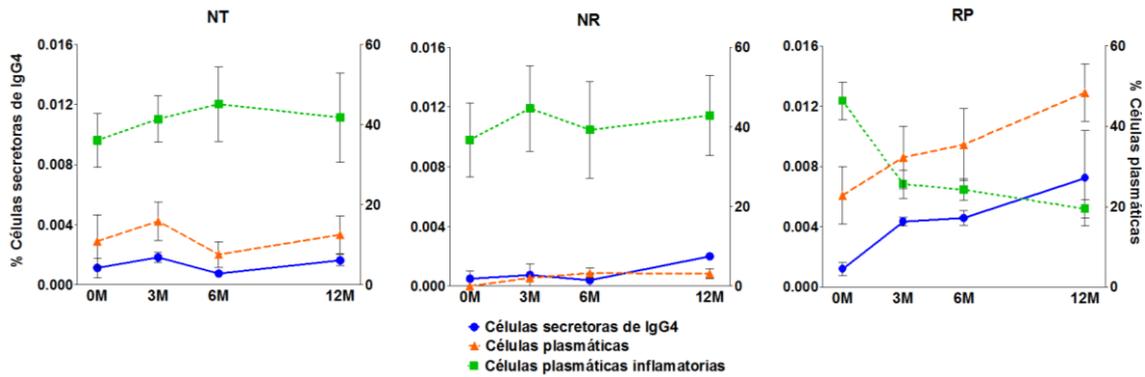


Figura 39. Porcentaje de células secretoras de IgG4, células plasmáticas y células plasmáticas inflamatorias (media y desviación estándar) durante un seguimiento de 12 meses en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

Finalmente, se determinaron los niveles de células Breg a lo largo del periodo de estudio, observándose un incremento progresivo pero no significativo en RP (Figura 40).

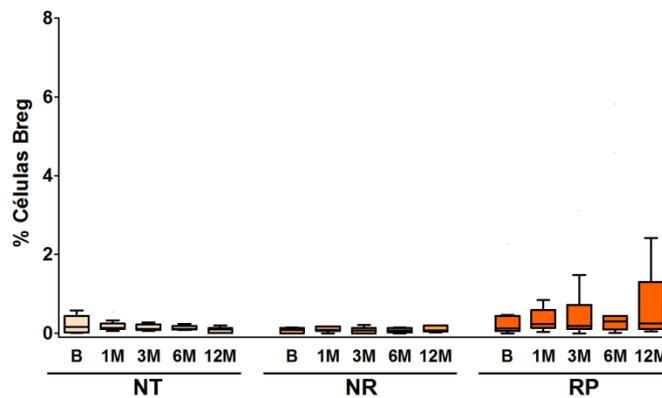


Figura 40. Porcentaje de células Breg durante un seguimiento de 12 meses en pacientes respondedores (RP), no respondedores (NR) y no tratados (NT) con ITSC-DP (mediana y rango intercuartílico)

4. Estudios funcionales de células T reguladoras tras la ITSC

En este objetivo se pretendió determinar los cambios que una ITSC-DP con éxito produce sobre la actividad supresora de las Treg. Por ello, se utilizaron solamente las células de pacientes con RA tratados con ITSC-DP que

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

demonstraron una buena respuesta al tratamiento, (RP) y pacientes con RA no tratados, (NT). Para analizar el cambio de funcionalidad de las Treg se incubaron estas células obtenidas a nivel basal y tras 12M con Tef obtenidas a estos mismos tiempos y de forma cruzada.

4.1. Fenotipado celular

Se determinaron los cambios en el porcentaje de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T (Th1, Th2, Th9 y linfocitos T productores de IL-10, IL-4 e IL-9) inducidas por las Treg en las diferentes combinaciones de cultivos descritos en el apartado 2.2.9 de la sección de Material y métodos.

Los resultados obtenidos demuestran que en RP, las Treg obtenidas a los 12M produjeron un incremento del porcentaje de células Th1, comparado con las Treg obtenidas a 0M o cuando no se incluían Treg, en co-cultivos con Tef obtenidas tanto a los 0M ($p=0.029$ y $p=0.009$, respectivamente) como a los 12M ($p=0.031$ y $p=0.008$, respectivamente). Respecto a los efectos de la ITSC-DP en las células Tef, se pudo apreciar un incremento significativo en el porcentaje de Th1 ($p=0.041$) en co-cultivos con Treg obtenidas a los 0M en RP.

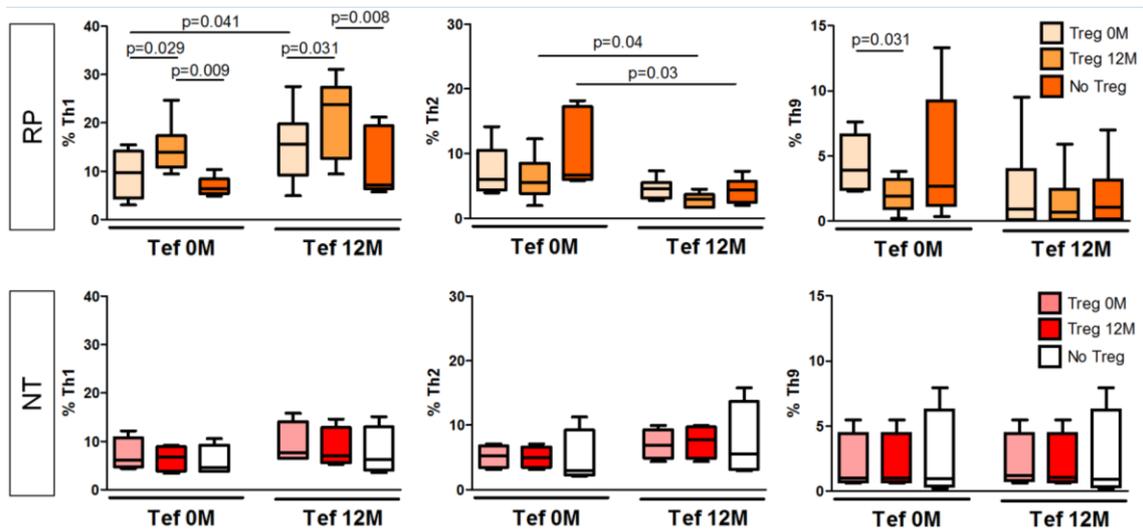


Figura 41. Porcentaje de linfocitos Th1, Th2 y Th9 en diferentes combinaciones de co-cultivos en pacientes respondedores (RP) y no tratados (NT) con ITSC-DP (mediana y rango intercuartílico).

V. Resultados

Por el contrario, se observó una reducción significativa en el porcentaje de Th2 tras 12M de tratamiento en los cultivos con Treg 12M ($p=0.04$) y sin Treg ($p=0.03$), comparado con los respectivos cultivos realizados con Tef 0M en RP. De forma paralela a las células Th2, en las Th9 solo se apreció una reducción significativa en los co-cultivos con Tef obtenidas a 0M y Treg obtenidas a 12M comparado con el co-cultivo de Tef 0M con Treg 0M ($p=0.031$) en RP (Figura 41).

En el caso de las células productoras de citoquinas, se observó que las Treg obtenidas a los 12M incrementaron el porcentaje de las células productoras de IL-10 comparado con las Treg obtenidas a los 0M y en ausencia de Treg co-cultivos con Tef obtenidas a los 0M ($p=0.025$ y $p=0.049$, respectivamente) y 12M ($p=0.03$ y $p=0.034$, respectivamente) en RP.

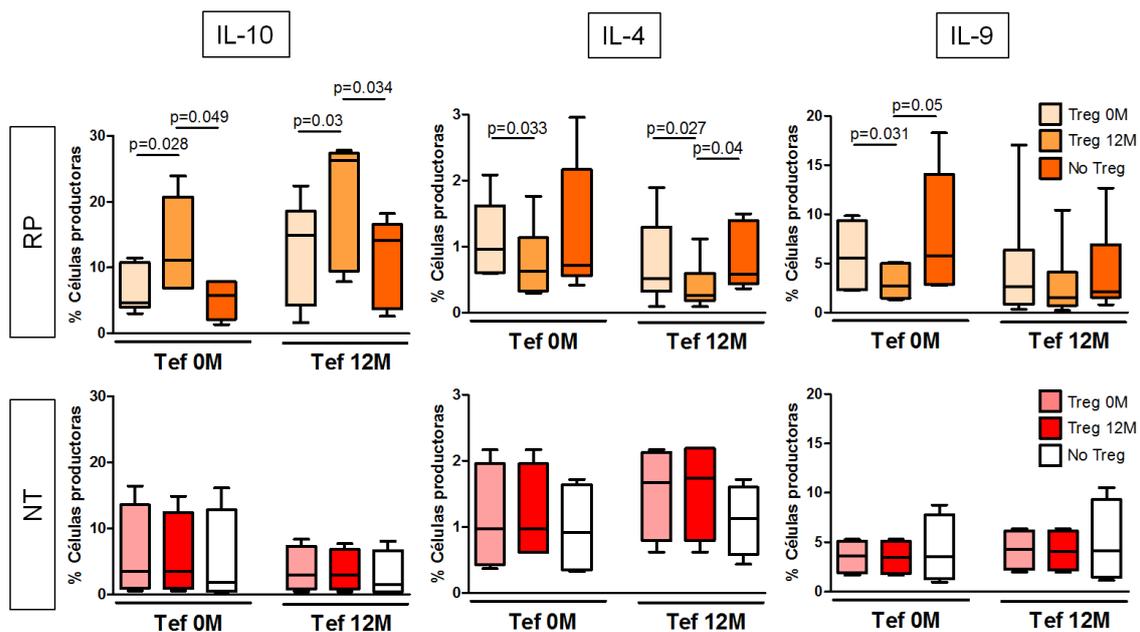


Figura 42. Porcentaje de células T CD4⁺ productoras de IL-10, IL-4 e IL-9 en diferentes combinaciones de co-cultivos en pacientes respondedores (RP) y no tratados (NT) con ITSC-DP (mediana y rango intercuartílico).

De manera opuesta, las Treg obtenidas a los 12M produjeron una reducción del porcentaje de las células productoras de IL-4 en co-cultivos con Tef obtenidas a los 0M y 12M, comparado con el efecto inducido por Treg obtenidas a los 0M ($p=0.033$ y $p=0.027$, respectivamente). Efectos similares

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

fueron observados comparando las células Tef obtenidas a los 12M en ausencia de Treg ($p=0.004$ para co-cultivos con Tef obtenidas a los 12M).

Finalmente, las Treg obtenidas a los 12M también disminuyeron el porcentaje de las células productoras de IL-9 comparado con las Treg obtenidas a los 0M y en ausencia de Treg, en co-cultivos con Tef obtenidas a los 0M ($p=0.031$ y $p=0.049$, respectivamente). No se observaron cambios en el porcentaje de células productoras de citoquinas en el grupo de NT (Figura 42).

4.2. Estudio de la capacidad supresora de las Treg sobre la respuesta proliferativa de las subpoblaciones de linfocitos T efectores (Th1, Th2 y Th9) y capacidad de restablecimiento del control de la respuesta alérgica.

Para analizar cambios en la capacidad supresora de las Treg durante la inmunoterapia, se determinaron los cambios en la respuesta proliferativa frente a DP de diferentes subpoblaciones celulares mediante la realización de co-cultivos celulares.

En RP se observó que las Treg obtenidas a los 12M produjeron un incremento de la proliferación de las células Th1, comparado con el efecto producido por las Treg obtenidas a 0M o en ausencia de Treg, en co-cultivos con Tef obtenidas tanto a los 0M ($p=0.004$ y $p=0.0045$, respectivamente) como a los 12M ($p=0.022$ y $p=0.0006$, respectivamente). Además, las Treg obtenidas a los 12M produjeron una reducción de la proliferación de las células Th2 y Th9 comparado con Treg obtenidas a los 0M, en co-cultivos con Tef obtenidas a los 0M ($p=0.04$ en ambos casos) (Figura 43).

Respecto a los efectos de la ITSC-DP en las células Tef, se pudo apreciar un incremento significativo en el porcentaje de proliferación de Th1 ($p=0.029$) en co-cultivos con Treg obtenidas a los 0M. El efecto contrario fue observado para la proliferación de Th2 y Th9 ($p=0.0001$ y $p=0.036$, respectivamente). Además, la proliferación de Th2 y Th9 se redujo entre 0M y 12M cuando se co-cultivaron con Treg obtenidas a los 12M ($p=0.012$ y $p=0.008$, respectivamente).

V. Resultados

La proliferación de Th2 también disminuyó entre 0M y 12M en ausencia de Treg ($p=0.0004$). No se observaron cambios en NT (Figura 43).

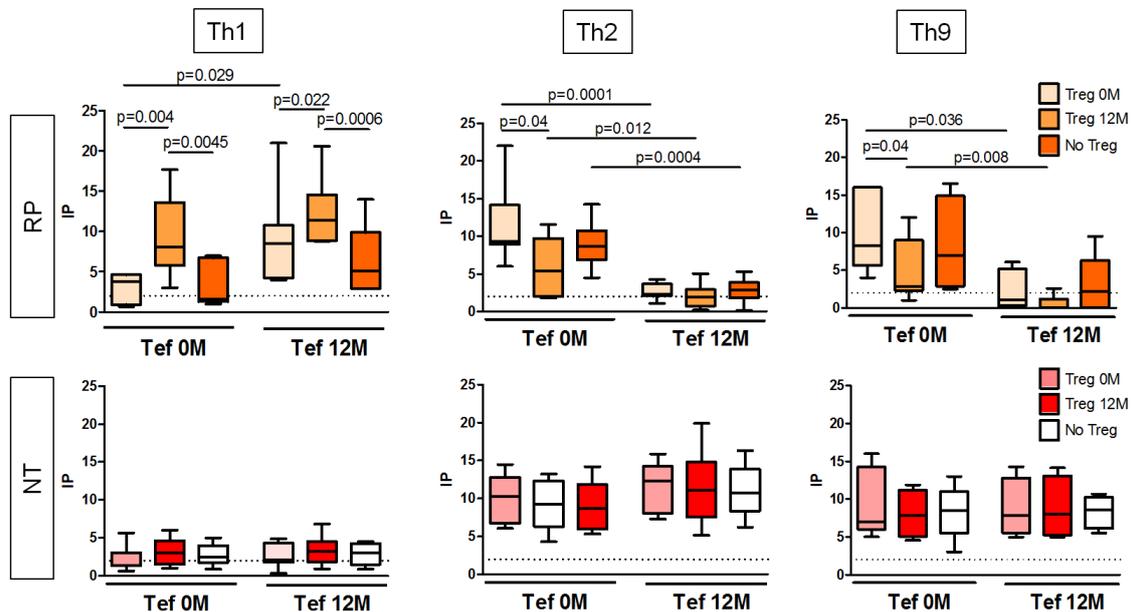


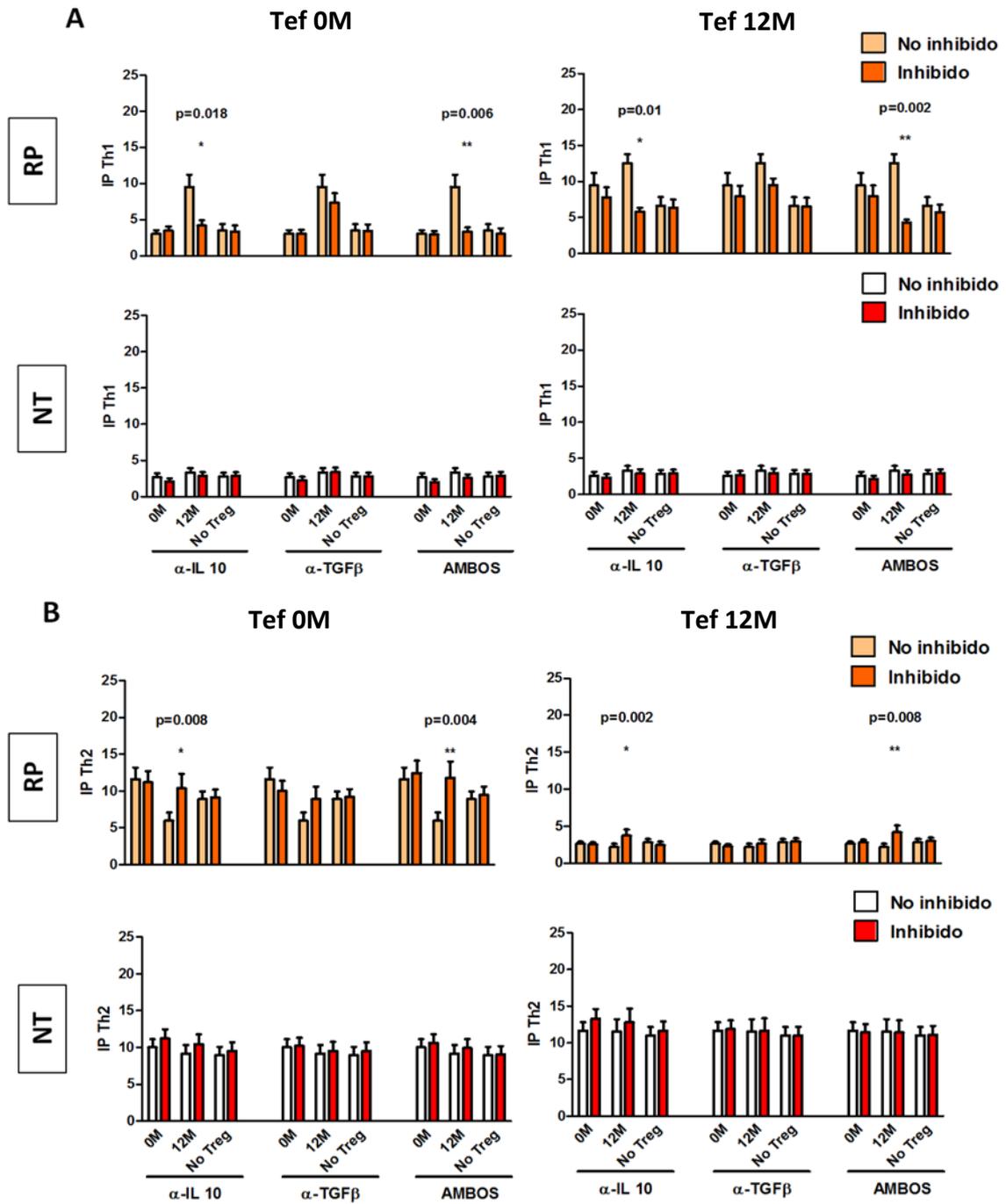
Figura 43. Proliferación celular de linfocitos Th1, Th2 y Th9 en diferentes combinaciones de co-cultivos en pacientes respondedores (RP) y no tratados (NT) con ITSC-DP (mediana y rango intercuartílico).

4.3. Estudio del mecanismo de supresión de las Treg mediante el uso de anticuerpos bloqueantes.

La actividad supresora de las Treg puede producirse mediante contacto celular o mediado por citoquinas, principalmente por IL-10 y TGF- β (entre otras). Se utilizaron anticuerpos bloqueantes (α -IL-10 y α -TGF- β) para tratar de definir el papel de esas citoquinas en la acción de las Treg como supresoras de la respuesta proliferativa de las diferentes subpoblaciones celulares.

Los resultados indicaron que solo se observan efectos bloqueantes en los cultivos en los que se incluyeron las Treg de 12M independientemente del tipo de Tef (0M o 12M) utilizadas. Los datos mostraron una disminución significativa de la proliferación de Th1 tanto con Tef 0M como 12M en presencia de α -IL-10 solo ($p=0.018$ y $p=0.01$) o combinado con α -TGF- β ($p=0.006$ y $p=0.002$) (Figura 44 A).

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.



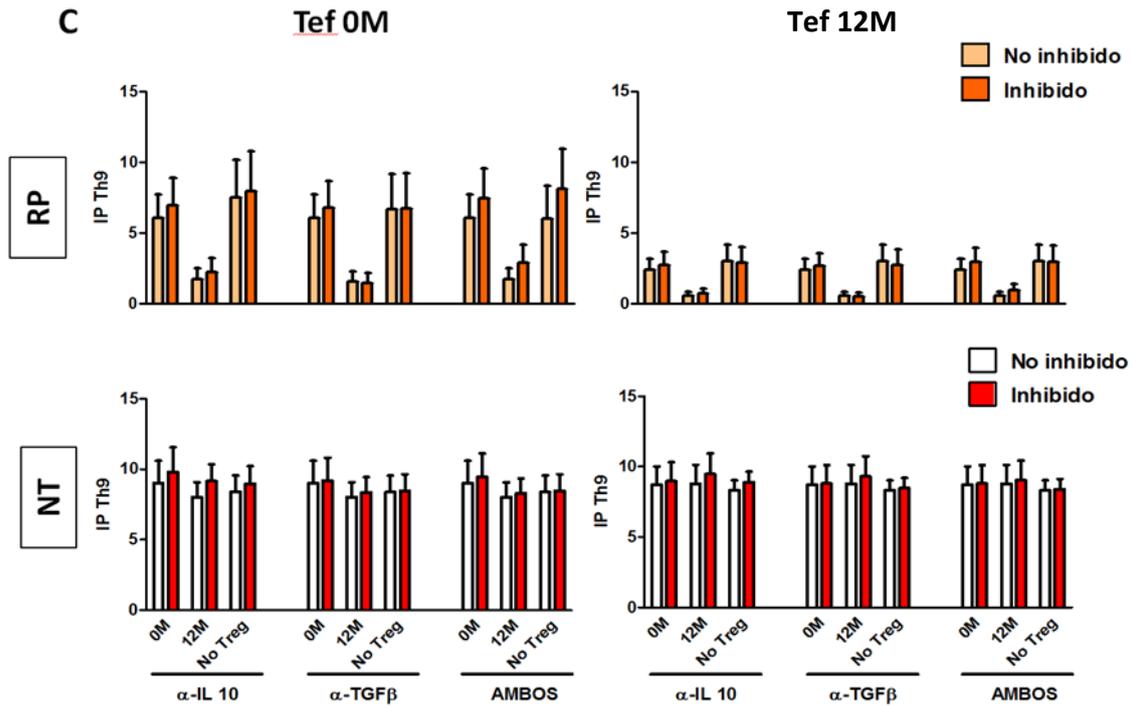


Figura 44. Inhibición de la proliferación de linfocitos (mediana) Th1 (A), Th2 (B) y Th9 (C) en diferentes combinaciones de co-cultivos tratados con α -IL-10, α -TGF- β o una combinación de ambos en pacientes respondedores (RP) y no tratados (NT) con ITSC-DP.

De manera opuesta, la proliferación de Th2 y Th9 (Figura 44 B y C, respectivamente) se incrementó, siendo solo significativa en el caso de Th2, a nivel basal o tras 12 meses, en presencia de α -IL-10 solo ($p=0.008$ y $p=0.002$) o combinado con α -TGF- β ($p=0.004$ y $p=0.008$) (Figura 44 B).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

VI. Discusión



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

VI. Discusión

Las enfermedades alérgicas respiratorias, como la RA, son bastante prevalentes, afectando a unos 500 millones de personas en el mundo (309), especialmente en occidente (289). Es frecuente que la RA presente comorbilidad con otras enfermedades, como la conjuntivitis alérgica, así como con otros desórdenes respiratorios como la rinosinusitis y, especialmente, el asma (310-312). La RA es principalmente causada por aeroalérgenos derivados de gramíneas, abedul, mascotas o ácaros (313-314), siendo entre estos últimos DP uno de los principales factores etiológicos en todo el mundo (309, 315). Estos trastornos afectan a la salud, calidad de vida (especialmente en los fenotipos más graves) y tienen un elevado coste para el sistema público de salud (316) debido al consumo de los fármacos que se requieren para el control de sus síntomas.

Clásicamente, las opciones de tratamiento eran la evitación del alérgeno, lo que es complicado, especialmente en el caso de aeroalérgenos no estacionales o el uso de un tratamiento farmacológico para la reducción de los síntomas. En el campo de las enfermedades alérgicas las terapias que buscan el restablecimiento de la tolerancia inmunológica (242) son el único tratamiento que puede alterar el curso de la enfermedad, y han demostrado ser una herramienta clínica segura y efectiva. Aunque el mecanismo inmunológico que lo produce no se conoce en profundidad, lo que se pretende con el tratamiento inmunomodulador es desviar el patrón de respuesta efectora de una reacción alérgica con patrón Th2 hacia un patrón Th0/1, con la generación de células Treg específicas del alérgeno, que supriman las células Tef específicas (157, 245-247).

La ITSC ha sido la inmunoterapia más estudiada para el tratamiento de síntomas causados por aeroalérgenos y veneno de himenópteros (292, 317), demostrando eficacia y un buen perfil de seguridad. Aunque existe un porcentaje de pacientes en los que el tratamiento no induce una disminución o desaparición de los síntomas, las diferencias entre pacientes que responden correctamente al tratamiento y pacientes que no lo hacen no han sido

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

investigadas en detalle. Estos datos serían de gran interés para descubrir las causas y así administrar el tratamiento más efectivo para cada paciente. Por ello, en este estudio nos hemos propuesto monitorizar los cambios inmunológicos producidos en diferentes subpoblaciones de linfocitos T y B en un grupo de sujetos con RA sensibilizados a DP durante el tratamiento con ITSC. Además, se evaluaron dichos cambios en relación con la eficacia de la IT.

Se ha descrito que la tasa de respuesta a la IT específica a DP suele ser de un 70% (252), por lo que, teniendo en cuenta el número de pacientes de nuestro estudio, correspondería encontrar unos 24 RP a la IT. Sorprendentemente, en los pacientes incluidos en el estudio se observó una tasa de respuesta de un 82.4%, indicando una mayor efectividad del tratamiento que lo publicado hasta el momento. Cabe destacar que el grupo de NR presentó un mayor tiempo de evolución de RA, lo que sugiere que la ITSC-DP tendría una mayor eficacia en estadios más tempranos de la enfermedad. También se observó una reducción del área de las pruebas intradérmicas en los pacientes tratados con ITSC-DP sin modificaciones en la reactividad al TPN independientemente de su respuesta al tratamiento. Esto sugiere que esos cambios son originados por el simple hecho de recibir la ITSC-DP, y no están relacionados con la respuesta clínica del paciente al tratamiento. Sin embargo, no sabemos cómo evolucionarían estas variables con un tratamiento más prolongado. En comparación, el grupo de NT respondió a una menor concentración en el TPN y mostró un ligero incremento del área de la prueba intradérmica a lo largo del tratamiento. Estos cambios están en concordancia con estudios previos realizados con IT de gramíneas (318) y pueden estar indicando un empeoramiento de la enfermedad en los pacientes que no recibieron tratamiento.

Históricamente, el efecto de la IT ha sido atribuido a un incremento de la respuesta inmune humoral IgG4 (244, 319-321). De esta forma se ha usado la relación IgEe/IgG4e como biomarcador de eficacia de la IT en RA. En este estudio se han detectado cambios en los niveles de IgEt, IgEe e IgG4e, así como un descenso en la proporción IgEe/IgG4e, solamente en los RP durante la IT. Otros estudios previos han asociado el incremento continuado de los niveles de

VI. Discusión

IgG4e durante los primeros 12 meses de IT con la mejora sintomatológica debido a la IT (244, 319-321). Esto ha sido atribuido a la actividad bloqueante de esta inmunoglobulina sobre la IgE (322-323) y, por tanto, de los procesos mediados por ésta, como la activación de mastocitos y basófilos (322-323).

Respecto a la respuesta celular, es conocido el papel clave de los basófilos en las reacciones alérgicas tipo 1. Sin embargo, los cambios en la reactividad de los basófilos durante la IT no han sido suficientemente estudiados. Se han obtenido resultados contradictorios en diferentes estudios de IT con gramíneas o látex (324-326), por lo que aún no se puede establecer como un biomarcador de mejoría clínica (324-326). En este estudio los cambios descritos en los niveles de inmunoglobulinas no produjeron una reducción en la reactividad de los basófilos a lo largo del tratamiento, tal y como se ha publicado en otros trabajos (327-329). De hecho, se puede apreciar un ligero incremento en el grupo de RP. Otros autores (325-326, 330-331) tampoco han demostrado una reducción de la reactividad del basófilo con ITSC. Esto puede estar relacionado con el periodo de tiempo estudiado, ya que recientemente se ha publicado que pacientes de IT sublingual a DP no mostraron una reducción de la reactividad de los basófilos hasta después de 24 meses de tratamiento (332). También puede ser debido a que la IT produce un incremento en la sensibilidad de los basófilos más que en la reactividad de los mismos (333), haciendo que con una menor concentración de alérgeno se activen.

La ITSC específica induce cambios en la respuesta frente al alérgeno que se ven reflejados en cambios en diferentes marcadores celulares. Se produce una variación desde respuestas tipo Th2 hacia Th1/Treg (menos inflamatorias) y una reducción de Th17 (334-335). La diferenciación de esas subpoblaciones celulares se encuentra regulada por factores de transcripción como *T-BET*, *GATA-3*, *ROR γ t* y *FOXP3* (336). Los niveles de ARNm expresados en RP tras 1 año de seguimiento revelaron una reducción en *GATA-3*, relacionado con la respuesta efectora Th2 (337), y un incremento en los niveles de *T-BET* y *FOXP3*, los cuales están considerados reguladores clave de la diferenciación celular de

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

las subpoblaciones Th1 y Treg respectivamente (338-339). Estos resultados se encuentran apoyados por otros estudios en los que también se ha observado un cambio de patrones Th2 hacia Th1 y Treg consecuencia de la IT (340-341). Aunque los factores de transcripción no se han analizado en poblaciones celulares aisladas, hemos encontrado resultados similares en el patrón observado en el fenotipado celular y de producción de citoquinas, lo que apoya los resultados obtenidos en la expresión de los factores de transcripción.

Es interesante señalar que en el análisis fenotípico de la respuesta específica a DP *in vitro* antes del inicio del tratamiento se mostraron dos patrones diferentes que se correspondían a la posterior respuesta que tuvieron los pacientes al tratamiento:

- a) El primer patrón muestra un estado de alta reactividad, principalmente observado en los pacientes RP, definido por bajas frecuencias celulares de Th1 y valores elevados de Th2, Th9 y Th17 así como de citoquinas proinflamatorias como IL-5, IL-9, IL-13 y TNF- α .
- b) El segundo patrón, definido por altas frecuencias de células Th1 y bajas frecuencias de Th2, Th9 y Th17, que fue detectado en los pacientes NR.

El grupo no tratado presentó un fenotipo intermedio en términos de reactividad, probablemente debido a que este grupo puede contener pacientes potencialmente RP y NR.

Estos datos indican que podríamos especular que presentar un estado de alta reactividad puede predisponer a una buena respuesta a la IT, lo cual podría ser un biomarcador de utilidad para decidir qué pacientes han de tratarse con ITSC-DP. No hay estudios previos que evidencien estas observaciones de estados reactivos basales.

Además, este estudio muestra por primera vez que estos cambios están relacionados con una mejora de los síntomas clínicos. Esto es particularmente importante cuando se compara con la evolución del grupo no tratado, donde el

VI. Discusión

patrón de respuesta Th2 fue el predominante, con incrementos significativos de *GATA-3* y *FOXP3*, probablemente debido a un empeoramiento de la respuesta frente al alérgeno. Curiosamente, los pacientes NR no mostraron cambios hacia ningún patrón de respuesta, posiblemente debido a que el tratamiento impidió un empeoramiento de los síntomas, pero no produjo el efecto deseado.

Tras un año de seguimiento se observó un cambio desde un patrón de respuesta Th2, Th9 y Th17 hacia Th1 y Treg, con cambios en sus correspondientes citoquinas (incremento en citoquinas Th1 e inmunosupresivas y descenso en citoquinas Th2). Esas variaciones están en consonancia con estudios anteriores (254, 342-343). Es importante puntualizar que el número de pacientes que no respondieron al tratamiento fue bastante pequeño, por lo que se limita el poder estadístico y nos impide detectar cambios para este grupo. A pesar de estas limitaciones, las diferencias estadísticas entre pacientes NR y RP sugieren diferencias inmunológicas entre estos grupos, siendo la primera vez que se relacionan variaciones en subpoblaciones Th y evolución clínica positiva. También es interesante señalar el papel que juegan las células Th9, ya que algunos autores han sugerido que éstas presentan una función patogénica en enfermedades inflamatorias (344-345), mientras que otros autores indican una función inmunosupresora (137, 346). Los resultados de nuestro estudio sugieren una función efectora, ya que después del año de tratamiento se produjo una reducción tanto en el número de células Th9 como de la producción de IL-9 en pacientes RP. No se apreciaron cambios ni a nivel celular ni de citoquinas en NRP, mientras que en los pacientes no tratados, hubo una tendencia hacia un incremento de respuesta celular tipo Th2.

Otros tipos celulares con gran importancia en la inmunomodulación mediada por IT específica en enfermedades alérgicas son las células B y células plasmáticas. Algunos estudios previos indican que la IT puede producir un incremento en el porcentaje de las células B memoria (278), específicamente las células Breg (197, 278). Sin embargo, no se han realizado estudios de otras

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

subpoblaciones, como por ejemplo las células plasmáticas, cruciales para la producción de IgE analizando sus cambios durante la IT.

Un resultado relevante de este estudio está relacionado con los cambios observados en la subpoblación de células B productoras de IgG4, ya que son células efectoras en la respuesta alérgica, y por tanto, dianas de la modulación durante la IT específica (197). Los resultados de este trabajo indican que los beneficios de la ITSC-DP pueden estar relacionados con el incremento de los niveles de células plasmáticas productoras de IgG4, lo cual se correlaciona con los resultados encontrados a nivel humoral de incremento de los niveles de IgG4e a DP.

En contra de lo esperado, las diferentes subpoblaciones de células B (linfocitos B, linfocitos B memoria, linfocitos B DP-específicas, linfocitos B memoria DP-específicas, linfocitos B que expresan IgE, linfocitos B memoria que expresan IgE, linfocitos B DP-específicas que expresan IgE y linfocitos B memoria DP-específicas que expresan IgE) no sufrieron ningún cambio directamente relacionado con la IT. Solo se observó una tendencia a aumentar de las células B memoria específicas a DP en RP. Estos datos contrastan con otros trabajos publicados por otros autores en IT con alérgenos alimentarios (278), donde se detectó un incremento en las células B memoria tras IT con proteínas de huevo. Estas discrepancias en los resultados pueden deberse a las diferencias existentes entre ambos alérgenos en su naturaleza y en la ruta de exposición. Además, en el caso del huevo, los pacientes no están continuamente expuestos al alérgeno, como si ocurre en el caso del DP.

Por otro lado, se observó que el porcentaje de células B memoria fue mayor en RP comparado con NR antes, durante y tras 12 meses de tratamiento. Como esas células son las responsables de la memoria inmunológica a largo plazo y la respuesta rápida en un segundo contacto con el alérgeno, su mayor presencia en RP puede confirmar el fenotipo de mayor reactividad definido en estos pacientes y que puede afectar a la respuesta frente al tratamiento. Esta observación apoya la hipótesis de que existen perfiles inmunológicos diferentes

VI. Discusión

entre pacientes que van a responder a la IT (mas reactivos) y aquellos que no van a responder. Si esto es así, la determinación de las células B, junto con los marcadores de células T anteriormente mencionados, podría utilizarse para la predicción de la eficacia de la IT antes de iniciar el tratamiento.

Los cambios en las Breg fueron menos acentuados que en estudios anteriores realizados con otros alérgenos, como venenos de abeja (197, 267, 347), probablemente debido a las diferencias en el método de administración de la IT: intermitente, subcutánea y en dosis altas, a diferencia de nuestro caso en el cual la exposición al alérgeno es continua, intranasal y a dosis bajas. Sin embargo, se encontró una correlación positiva entre el porcentaje de Breg que expresaban IL-10 y la respuesta clínica, señalando su papel en la inducción de tolerancia.

La evolución durante la IT de los plasmablastos, subtipo celular intermedio entre las células B activadas y las células plasmáticas (183), que pueden producir IgE (187), no había sido estudiada anteriormente. Además, aunque dichas células se encuentran principalmente en los tejidos linfoides secundarios, se ha descrito su presencia en sangre periférica en pacientes durante reacciones inmunes (348-349). En este estudio, se observó un descenso de plasmablastos y células plasmáticas en RP, observándose estos cambios desde las primeras etapas del tratamiento. Esto podría deberse a un descenso en las CPI, que son reclutadas a los sitios de inflamación (183-185). Un futuro estudio podría incluir el análisis de los isotipos de los anticuerpos producidos por estas células, ya que son las células efectoras en episodios alérgicos. De hecho, se ha observado un descenso paralelo de los niveles de esta subpoblación celular junto con una disminución de la proporción IgEe/IgG4e en suero. Este descenso puede ser producido por la retención de estas células en los tejidos o por una reducción global en el número de estas células. Sin embargo, sea cual sea la naturaleza de la reducción de las CPI, parece estar relacionado con un tratamiento satisfactorio de IT y puede ser usado como un biomarcador de eficacia clínica.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

Respecto a las CPVL, que pueden sobrevivir durante años en el organismo (184, 186-187), se encontró un incremento tras 1 mes de tratamiento. Sin embargo, después los niveles regresaron a sus valores basales, lo cual puede atribuirse a la recirculación hacia la médula tal y como se ha descrito previamente (183-185).

El papel de las Treg en la inducción de la tolerancia durante la IT específica de alérgenos está ampliamente aceptado. Se sabe que las Treg pueden suprimir una gran variedad de células T efectoras implicadas en la respuesta alérgica, incluyendo Th2, Th9 y Th17 (350). Este mecanismo de supresión es diferente, según si son Treg naturales o Treg inducidas. Las primeras poseen un mecanismo de supresión mediante contacto célula-célula, mientras que en las segundas este mecanismo está mediado por la secreción de citoquinas inmunomoduladoras (147, 260, 351).

Al igual que los resultados obtenidos en este estudio, otros trabajos han mostrado un incremento en el porcentaje de Treg durante el tratamiento (256, 279-281, 306), si bien esto no ha sido descrito por otros (282-286). Además, se ha observado que células Treg provenientes de donantes no sensibilizados poseen mayor capacidad de suprimir respuestas proliferativas específicas de alérgeno de células efectoras que las Treg de individuos sensibilizados (352). Estos datos sugieren la implicación de otros mecanismos de regulación que afectan a la funcionalidad de las Treg de un modo específico del alérgeno durante la IT, ya sea modificando su mecanismo de acción o su capacidad supresora. Sobre esta idea se han realizado varios estudios, demostrando cambios epigenéticos en estas células. Estas modificaciones son cruciales para realizar su función supresora y pueden tener un papel importante en la inducción de tolerancia (353-355).

Para evaluar si se producen cambios funcionales durante ITSC en las células Treg en este trabajo se establecieron diferentes combinaciones de cocultivos, usando Treg obtenidas antes y después de 1 año de ITSC con DP. Los resultados obtenidos demostraron un aumento de actividad reguladora de las

VI. Discusión

Treg obtenidas tras 12 meses de ITSC-DP de pacientes RP. En presencia de dichas Treg observamos la inducción de cambios tanto en el porcentaje de células como en la respuesta proliferativa específica ante DP de las mismas, con un incremento de Th1 y un descenso de Th2 y Th9. Además, las Treg generadas tras un año de ITSC-DP fueron capaces de incrementar el porcentaje de linfocitos T secretores de IL-10, resultado similar al descrito en IT sublingual específica de DP (343, 356). Sin embargo, las Treg basales (antes del tratamiento con ITSC-DP) de los pacientes RP no tenían esta capacidad. Todos estos resultados indican que la IT actúa sobre las Treg inducidas, incrementando su capacidad de redirigir la respuesta alérgica en respuesta tolerante (357-359).

Las iTreg tienen algunas diferencias respecto a las Treg naturales, no solo en su origen sino también en su función y patrón de producción de citoquinas (360-362). Las iTreg son productoras de citoquinas supresoras, tales como IL-10 y TGF- β (256, 363-364). La IL-10 puede suprimir células T efectoras mediante la inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias e IgE, además de inducir la secreción de IgG4 (365). Por otro lado, se sabe que el TGF- β inhibe citoquinas proinflamatorias, promueve la producción de IL-10 en células T (366) e induce la diferenciación de Treg a partir de células T vírgenes CD4⁺CD25⁻ (367-368). Para aclarar si el mecanismo implicado en la actividad supresora de las Treg inducidas está mediada por IL-10 o TGF- β , se analizaron los cambios en la respuesta proliferativa de las células T en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes de la actividad de estas citoquinas. Los resultados demostraron que la modulación de la respuesta generada por las Treg inducidas tras 12 meses de IT fue inhibida significativamente en presencia de α -IL-10. Este anticuerpo revertió la inhibición de la proliferación de células Th1 y bloqueó la supresión de las respuestas proliferativas de Th2 y Th9 en RP. Estos resultados concuerdan con los datos aportados por otros autores en IT sublingual (351, 369). Además, cuando ambas citoquinas fueron bloqueadas simultáneamente no se apreciaron efectos diferenciales respecto a la inhibición producida por el anticuerpo bloqueante de IL-10, demostrando la ausencia de interacciones entre ambas citoquinas.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

Hay algunos estudios que indican que el papel del TFG- β está relacionado con la actividad de las Treg (370). Sin embargo, en nuestro estudio parece que el mecanismo supresor del TFG- β no tiene un efecto importante. Estas discrepancias pueden ser explicadas por el tiempo en que se ha realizado el estudio, ya que se sabe que el efecto supresor del TFG- β sobre las células efectoras puede ser más importante en fases más tempranas del tratamiento (a los 6 meses de IT) y no en fases más tardías (12 y 24 meses) (370). Nuestros resultados están en consonancia con Bohle (255), que describió que el efecto supresor de la proliferación alérgeno específica de células efectoras está mediado por IL-10, pero no por TGF- β en pacientes con IT sublingual frente al polen de abedul.

Este estudio presenta un análisis detallado de ITSC-DP en pacientes con RA a DP, pero presenta algunas limitaciones. Aunque se ha analizado la eficacia de la IT tanto en pacientes tratados como NT, no se incluyó un grupo control de pacientes no alérgicos no tratados a modo de control negativo. Los futuros estudios deberían incluir un mayor número de pacientes para aumentar la reducida muestra del grupo de NR, además del grupo control anteriormente mencionado así como un seguimiento de los resultados clínicos y cambios inmunológicos durante un intervalo de tiempo más prolongado y el análisis del mantenimiento de la tolerancia tras la interrupción del tratamiento. Habría que realizar también las determinaciones del porcentaje de Th1, Th2, Th9, Th17 y Treg, así como la determinación de citoquinas y factores de transcripción en los tiempos 1 mes, 3 meses, y 6 meses, con objeto de obtener una monitorización más completa del efecto de la IT a lo largo del tratamiento. También sería interesante realizar los estudios funcionales de las Treg con células obtenidas en fases más tempranas de la ITSC-DP, con el objeto de evaluar el papel supresor de la respuesta alérgica del TGF- β en estadios más tempranos y la inclusión del grupo de NR, como grupo intermedio del estudio.

En resumen, el trabajo descrito en esta tesis doctoral demuestra que esta ITSC-DP tiene una eficacia clínica mayor a las descritas anteriormente en

VI. Discusión

pacientes con RA específica a DP, probablemente debido que ésta se ve acompañada por unos cambios a nivel inmunológico que modulan la respuesta desde el patrón Th2 con producción de IgEe a DP y linfocitos Th2, Th9 y Th17 y CPI hacia uno Th1 con disminución de los anticuerpos y de las células anteriores, acompañado de un aumento de IgG4e, linfocitos Th1, Treg y células B productoras de IgG4. Se ha demostrado que estos cambios están producidos por las células Treg inducidas durante el tratamiento, que actúan mediante la liberación de IL-10. Además, en función de la respuesta clínica de los pacientes a la IT se pueden apreciar diferencias inmunológicas a nivel basal, las cuales pueden ser utilizadas como marcadores predictivos de la eficacia de la IT.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

VII. Conclusiones



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

VII. Conclusiones

1. La ITSC-DP ha demostrado tener una eficacia clínica en el 82.4% de los pacientes alérgicos a DP incluidos en el estudio, eficacia definida por una mejora tanto en la sintomatología como un menor uso de medicación.
2. A nivel basal los RP presentan niveles más elevados de linfocitos B memoria, Th2, Th9 y Th17 y niveles más bajos de Th1 y Treg comparados con los NR. Los NT presentan un fenotipo intermedio. Estos perfiles podrían utilizarse como biomarcadores tempranos de eficacia clínica de la IT.
3. La ITSC-DP no indujo cambios en la reactividad del basófilo, por lo que podemos afirmar que no es un marcador adecuado de eficacia para IT en periodos tan cortos.
4. La mejoría clínica está asociada con un incremento de los niveles de IgG4e y un cambio de patrón de respuesta Th2 hacia otro menos inflamatorio Th1/Treg. Además, también se asocia con una reducción temprana de la reactividad de los plasmablastos y de las células plasmáticas inflamatorias.
5. La ITSC-DP induce cambios tanto en la frecuencia como en la funcionalidad de las Treg inducidas que están implicadas en la supresión de la respuesta alérgica a nivel inmunológico.
6. Las Treg inducidas por la ITSC-DP son las encargadas de redirigir la respuesta tipo Th2 hacia una respuesta menos inflamatoria, tipo Th1/Treg.
7. La supresión de la respuesta alérgica ejercida por las células Treg inducidas durante la IT está mediada por la producción de IL-10.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

VIII. Anexos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Anexo 1. Documento de aprobación del estudio por parte del comité de ética



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

HRU Carlos Haya

**LA COMISIÓN DE ÉTICA Y DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL
REGIONAL UNIVERSITARIO CARLOS HAYA**

INFORMA

Que el proyecto titulado:

- **MECANISMOS INMUNOLÓGICOS IMPLICADOS EN LA INMUNOTERAPIA ESPECÍFICA CON ALERGENOS. PAPEL DE LAS CÉLULAS REGULADORAS Y EFECTORAS ESPECÍFICAS.**

Cuyo Investigador principal es:

- **M^a JOSÉ TORRES JAÉN**

Ha sido evaluado, por esta comisión y este centro, considerando del máximo interés, tanto por la importancia del tema como por la experiencia del equipo investigador en este campo y declara que este proyecto es viable en todos sus términos por lo que se aprueba.

Por todo ello, firmo el presente en Málaga,



Firmado: José Antonio Trujillo Ruiz
Director Médico
Hospital Regional Carlos Haya



Anexo 2. Documento de información de la IT para el paciente

CONSENTIMIENTO INFORMADO-INFORMACIÓN AL PACIENTE

ANTES DE PROCEDER A LA FIRMA DE ESTE CONSENTIMIENTO INFORMADO, LEA ATENTAMENTE LA INFORMACIÓN QUE A CONTINUACIÓN SE LE FACILITA Y REALICE LAS PREGUNTAS QUE CONSIDERE OPORTUNAS.

NATURALEZA

EN EL SERVICIO DE ALERGOLOGÍA DEL HOSPITAL REGIONAL UNIVERSITARIO DE MÁLAGA SE ESTÁ DESARROLLANDO UN ESTUDIO QUE PRETENDE MEJORAR LOS CONOCIMIENTOS ACERCA DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA RESPUESTA A LA INMUNOTERAPIA ESPECÍFICA CON ÁCAROS DEL POLVO DOMÉSTICO.

EL ESTUDIO TENDRÁ UNA DURACIÓN DE TRES AÑOS Y PRECISA DE LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE PERIÓDICAS PARA LLEVAR A CABO ESTAS INVESTIGACIONES. ADEMÁS EL PACIENTE SERÁ REVISADO PERIÓDICAMENTE PARA CONTROLAR SU ENFERMEDAD Y EVOLUCIÓN.

EN EL ESTUDIO NO PUEDEN PARTICIPAR PACIENTES DE ESPECIAL RIESGO, QUE OFREZCAN DIFICULTADES PARA SU EXPLORACIÓN Y/O QUE TENGAN OTRAS PATOLOGÍAS COMO ENFERMEDADES AUTOINMUNES, CUTÁNEAS Y HEMATOLÓGICAS.

IMPORTANCIA

EN LOS ÚLTIMOS AÑOS LA PREVALENCIA DE LA RINITIS ALÉRGICA HA AUMENTADO DE FORMA ALARMANTE, ESPECIALMENTE EN PAÍSES CON ESTILO DE VIDA OCCIDENTAL. EL TRATAMIENTO HABITUAL INCLUYE LA EDUCACIÓN DEL PACIENTE, LA EVITACIÓN DEL ALÉRGENO, EL SINTOMÁTICO (FARMACOLÓGICO) Y LA INMUNOTERAPIA ESPECÍFICA CON ALÉRGENO. LA INMUNOTERAPIA ES EL ÚNICO TRATAMIENTO ETIOLÓGICO CAPAZ DE ACTUAR SOBRE LOS MECANISMOS INMUNOLÓGICOS DE LA RINITIS Y SE DESCONOCE POR QUÉ NO ES

EFFECTIVA EN UN GRUPO DE PACIENTES. EL CONOCIMIENTO DE LOS MECANISMOS INMUNOLÓGICOS IMPLICADOS EN LA INMUNOTERAPIA NOS PUEDE AYUDAR A IDENTIFICAR EN QUÉ PACIENTES VA A SER EFFECTIVA Y EN CUÁLES NO.

ES UN TRABAJO DE CARÁCTER CIENTÍFICO Y NO TIENE FINES LUCRATIVOS. SU PARTICIPACIÓN EN ÉL VA A CONTRIBUIR A MEJORAR EL CONOCIMIENTO DEL PROCESO QUE SE ANALIZA Y QUE REQUIERE LA EVALUACIÓN DE UN NÚMERO GRANDE DE INDIVIDUOS PARA PODER VALIDARLA.

IMPLICACIONES PARA EL PACIENTE

LA DONACIÓN/PARTICIPACIÓN ES TOTALMENTE VOLUNTARIA.

EL DONANTE/PACIENTE PUEDE RETIRARSE DEL ESTUDIO CUANDO ASI LO MANIFIESTE, SIN DAR EXPLICACIONES Y SIN QUE ESTO REPERCUTA EN SUS CUIDADOS MÉDICOS.

TODOS LOS DATOS DE CARÁCTER PERSONAL, OBTENIDOS EN ESTE ESTUDIO SON CONFIDENCIALES Y SE TRATARÁN CONFORME A LA LEY ORGÁNICA DE PROTECCIÓN DE DATOS DE CARÁCTER PERSONAL 15/99.

LA DONACIÓN/INFORMACIÓN OBTENIDA SE UTILIZARÁ EXCLUSIVAMENTE PARA LOS FINES ESPECÍFICOS DE ESTE ESTUDIO.

RIESGOS DE LA INVESTIGACIÓN PARA EL DONANTE/PACIENTE

EL DIAGNÓSTICO DE RINITIS ALÉRGICA CONSTA DE LA REALIZACIÓN DE PRUEBAS CUTÁNEAS, QUE CONSISTE EN LA APLICACIÓN DE CANTIDADES MÍNIMAS DE ALÉRGENOS IRRITANTES EN LA PIEL. PARA VER SI SE PRODUCEN PEQUEÑAS REACCIONES CUTÁNEAS. TAMBIÉN SE REALIZARÁ UNA EXTRACCIÓN DE SANGRE PARA ESTUDIO DE CONFIRMACIÓN IN VITRO MEDIANTE LA CUANTIFICACIÓN EN SUERO DE LA IGE ESPECÍFICA Y UN TEST DE PROVOCACIÓN NASAL CON DP.

ESTAS PRUEBAS NO ESTÁN LIBRES DE RIESGO Y RARAMENTE PUEDEN APARECER COMPLICACIONES QUE SON GENERALMENTE MENORES. LAS PRUEBAS SE REALIZARÁN CON EL EQUIPO TÉCNICO Y PERSONAL

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

SANITARIO ESPECIALIZADO EN LAS MISMAS, ESTANDO PROTEGIDO CONTINUAMENTE CON ASISTENCIA MÉDICA Y SANITARIA ADECUADA Y CON LOS TRATAMIENTOS QUE PRECISE.

PARA LA TOMA DE MUESTRAS SERIADAS, LOS RIESGOS A LOS QUE SE EXPONEN LOS PACIENTES SON MÍNIMOS, YA QUE LA EXTRACCIÓN DE SANGRE ES UNA PRÁCTICA HABITUAL QUE NO SUELE PRODUCIR COMPLICACIONES, SALVO LIGEROS HEMATOMAS, CUANDO SE REALIZA POR EL PERSONAL TÉCNICO AUTORIZADO.

SI REQUIERE INFORMACIÓN ADICIONAL SE PUEDE PONER EN CONTACTO CON NUESTRO PERSONAL DEL SERVICIO DE ALERGOLOGÍA EN EL TELÉFONO 951290313, O CON EL INVESTIGADOR RESPONSABLE, EN EL TELÉFONO 627508541, O EN EL CORREO ELECTRÓNICO: MARIAJ.TORRES.SSPA@JUNTADEANDALUCIA.ES

FIRMA DEL PACIENTE
INVESTIGADOR

POR EL EQUIPO

NOMBRE

DR/A.

FECHA

FECHA:

Anexo 3. Documento de información y consentimiento informado escrito.

1. DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Este documento sirve para que usted otorgue su consentimiento para donar sus muestras biológicas, o las del sujeto al que representa, al Biobanco indicado, establecimiento público, sin ánimo de lucro, dependiente de la Consejería de Salud/del Servicio Andaluz de Salud, que acoge colecciones de muestras biológicas concebidas con fines diagnósticos o de investigación biomédica y organizadas como una unidad técnica con criterios de calidad, orden y destino, donde serán conservadas hasta que se agoten por su uso, salvo que usted solicitara su eliminación. Las muestras biológicas son un excelente elemento para la investigación de enfermedades. A través de dichas investigaciones se podrán obtener datos que permitirán mejorar el conocimiento sobre la aparición, desarrollo y tratamiento de multitud de enfermedades. Esta hoja de información puede contener palabras que usted no entienda. Por favor, pídale al profesional sanitario que le explique la información que no comprenda.

Tómese el tiempo necesario para decidir si quiere o no donar su muestra biológica y consulte a personas de su confianza si lo desea. Para consultas que desee plantear posteriormente, podrá dirigirse al Biobanco, a la dirección de correo electrónico: **biohbanco.hch.sspa@juntadeandalucia.es**

Las muestras biológicas donadas y sus datos clínicos asociados se utilizarán de conformidad con lo establecido en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica (en adelante Ley de Investigación biomédica). Es posible que la información obtenida de las investigaciones en las que se utilicen sus muestras no le genere un beneficio directo, pero habrá contribuido al avance de la medicina y del conocimiento de diversas enfermedades, lo que supondrá, sin duda, un beneficio para la sociedad.

La donación es voluntaria y altruista, por lo que usted no tendrá derecho alguno sobre los resultados que pudieran derivarse de las investigaciones que se lleven a cabo con dichas muestras, de conformidad con la normativa vigente. Su decisión de donar o no, no afectará a su asistencia sanitaria. En el apartado dedicado al consentimiento (2.3), usted podrá decidir si quiere que sus muestras se conserven de forma codificada (en cuyo caso se protege su identidad con un código anonimizada (eliminándose de forma irreversible toda vinculación con su identidad).

Sus muestras y los datos asociados a las mismas sólo se cederán a terceros que las utilicen en investigación biomédica de manera anónima o disociada.

1.1. LO QUE USTED DEBE SABER:

1. Obtención de las muestras

Las muestras serán obtenidas durante el procedimiento médico-quirúrgico al que va a someterse o se ha sometido durante su proceso asistencial, o a través de un procedimiento expreso para obtenerla, según lo indicado en el apartado sobre consentimiento (2.3).

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

En el caso de que usted done las muestras obtenidas durante procedimientos médicoquirúrgicos asistenciales, no existe ningún inconveniente adicional derivado de la donación de las mismas, porque lo que donaría sería el excedente que quedara de dichas muestras.

Si, por el contrario, las muestras fueran extraídas expresamente para la donación para investigación biomédica podrían existir inconvenientes vinculados con la obtención de las mismas de las que usted será debidamente informado.

2. Utilización de las muestras

Usted autoriza a que las muestras donadas sean utilizadas en investigación biomédica pudiendo establecer restricciones a su utilización. Las muestras sólo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación científicamente avalados, que cumplan las exigencias legales y los principios éticos que rigen la investigación en salud y que sean autorizados por los órganos competentes, de conformidad con lo establecido en la normativa vigente.

Cuando, por razones de salud, usted o su familia lo necesiten, podrán hacer uso de las muestras, siempre que no se hayan agotado o eliminado y no se encuentren anonimizadas.

3. Disponibilidad de la información sobre la muestra

Si lo solicita, el Biobanco le facilitará la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras donadas, si éstas no hubieran sido anonimizadas.

El Biobanco mantiene un registro detallado del lugar de realización de los análisis posteriores. La información que se obtenga puede tener implicaciones para sus familiares, por lo que debe transmitirles dicha información.

4. Posibilidad de ponerse nuevamente en contacto

Puede que sea necesario ponerse en contacto nuevamente con usted, con el fin de recabar datos o muestras adicionales, proporcionarle la información relevante para su salud, salvo que haya solicitado que las muestras sean anonimizadas.

5. Protección de datos y confidencialidad de la información

La información proporcionada en este apartado será aplicable siempre que sus muestras no se encuentren anonimizadas. Los datos personales recabados serán confidenciales y tratados de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y su normativa de desarrollo, y la Ley de Investigación biomédica.

Sus datos de carácter personal serán incorporados a un fichero automatizado, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, cuya titularidad corresponde al Servicio Andaluz de Salud. Sólo los responsables del Biobanco podrán identificar a quién corresponde cada muestra o dato. Podrá ejercer los derechos de acceso, rectificación, oposición y cancelación de sus datos personales, reconocidos en la citada Ley Orgánica 15/1999, con las limitaciones establecidas en dicha Ley. Para

ello, deberá dirigirse a la Dirección General de Asistencia Sanitaria del Servicio Andaluz de Salud, Avenida de la Constitución, núm. 18, de Sevilla.

6. Derecho de revocación del consentimiento

Salvo que sus muestras se encuentren anonimizadas, podrá revocar o retirar, en cualquier momento, el consentimiento prestado. Para ello, deberá dirigirse al Biobanco, pudiendo solicitar la eliminación o la anonimización de las muestras. Los efectos de la revocación no se extenderán a las investigaciones llevadas a cabo con anterioridad.

7. Información relativa a análisis genéticos

Salvo que usted manifieste lo contrario en el apartado dedicado al consentimiento, se podrán realizar análisis genéticos. Excepto si solicita que sus muestras sean anonimizadas, tiene derecho a conocer los datos genéticos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas, así como de la información relativa a su salud derivada de dichos análisis, según los términos en que exprese su voluntad en el apartado 2.3.

Si no desea recibir dicha información y ésta fuera necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar o a un representante. La comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para evitar tal perjuicio.

2. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO

2.1. 2.1. DATOS DEL/DE LA DONANTE Y DE SU REPRESENTANTE (éste último sólo en caso de incapacidad del/de la donante):

Apellidos y nombre del Donante:

DNI / NIE:

NUHSA:

Apellidos y nombre del/de la representante legal:

DNI / NIE del/de la representante legal:

2.2. PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO:

Los siguientes profesionales declaran que se ha explicado la información relativa a la donación de muestras biológicas al Biobanco:

Apellidos y nombre del profesional

Fecha

Firma

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

2.3. CONSENTIMIENTO:

Yo, D./Dña. declaro bajo mi responsabilidad que he leído y comprendido el Formulario de Información, del que se me ha entregado un ejemplar.

He recibido suficiente información sobre la donación de muestras biológicas y sobre la posible realización de análisis genéticos sobre las mismas y he podido hacer preguntas sobre la información recibida y hablar con el profesional indicado, quien me ha resuelto todas las dudas que le he planteado.

Manifiesto mi voluntad de donar mis muestras biológicas y permitir el tratamiento de los datos asociados a la misma al Biobanco, procedente de:

Excedente del procedimiento diagnóstico, terapéutico o quirúrgico al que va a someterse o se ha sometido.....

La obtención de forma expresa.....
.....
.....

Deseo que dichas muestras y los datos clínicos asociados sean tratadas de la siguiente forma:

Codificada (serán identificadas por un código, desligándose de la información que me identifica, siendo posible volver a ligarlas conmigo) o

Anonimizada (no se podrán asociar las muestras conmigo, por haberse eliminado de forma irreversible la vinculación entre las mismas y mi identidad).

Deseo establecer **restricciones** respecto al uso de la muestra, para que no sea utilizada en.....

Autorizo que se pueda contactar conmigo posteriormente: **SI** **NO**

En caso afirmativo, por favor, indique el medio de hacerlo.....

Autorizo a ser informado/a de los datos genéticos y otros de carácter personal obtenidos durante la investigación relativa a mi salud

Marque lo que proceda: **SI** **NO**

Sé que puedo **revocar**, en cualquier momento, el consentimiento otorgado en este documento.

En a de de

El/La Donante

El/La Representante legal (sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:

3. REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO PARA USO DE MUESTRAS DONADAS:

Yo, D./Dña.....revoco el consentimiento informado otorgado con fecha (especificar fecha aproximada y/o procedimiento:.....

.....) **y solicito:**

La eliminación de las muestras donadas

La anonimización de las mismas

Otras consideraciones:

.....
.....
.....

En a de de

El/La Donante

El/La Representante legal (sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.: Fdo.:



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

IX. Bibliografía



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

VIII Bibliografía

1. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 May;113(5):832-6.
2. Weck ALD. Immunopathological mechanisms and clinical aspects of allergic reactions to drugs. B H Berlin, Springer-Verlag1983. p. 75-133.
3. Gell P, R.R.A. C. Clinical aspects of immunology. Oxford, UK: Blackwell. 1963.
4. Vercelli D. Immunology of IgE. In: Adkinson NF, Brochner BS, Busse WW, Holgate ST, Lemanske RF, Simons FE, editors. *Middleton's Allergy*, 7th Edition: Elsevier; 2009.
5. Vercelli D. *Middleton's Allergy*. 7^o Edition ed. Elsevier, editor2009.
6. Monticelli S, De Monte L, Vercelli D. Molecular regulation of IgE switching: let's walk hand in hand. *Allergy.* 1998;53(45 Suppl):6-8.
7. Sutton BJ, Gould HJ. The human IgE network. *Nature.* 1993 Dec 2;366(6454):421-8.
8. Siraganian RP. Mechanism of IgE-mediated hypersensitivity. In: Middleton E, Reed CE, Elliot EF, Adkinson NF, Yunginger JW, editors. *Middleton's Allergy: Principles and Practice*. Mosby: St. Louis1988. p. 105-34.
9. Teschke R, Danan G. Diagnosis and Management of Drug-Induced Liver Injury (DILI) in Patients with Pre-Existing Liver Disease. *Drug Saf.* 2016 Aug;39(8):729-44.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

10. Choudhary S, McLeod M, Torchia D, Romanelli P. Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) Syndrome. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2013 Jun;6(6):31-7.
11. Ishizaka K, Ishizaka T. Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol.* 1967 Dec;99(6):1187-98.
12. Yazdanbakhsh M, van den Biggelaar A, Maizels RM. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends Immunol.* 2001 Jul;22(7):372-7.
13. Maizels N. Yin outwits Yang at the IgE locus. *Nat Immunol.* 2003 Jan;4(1):7-8.
14. Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol.* 2003 Sep;3(9):733-44.
15. Garman SC, Wurzburg BA, Tarchevskaya SS, Kinet JP, Jardetzky TS. Structure of the Fc fragment of human IgE bound to its high-affinity receptor Fc epsilonRI alpha. *Nature.* 2000 Jul 20;406(6793):259-66.
16. Kulczycki A. The role of IgE. *Allergy: An international Textbook: Wiley and Sons; 1987. p. 37-47.*
17. Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol.* 2003 Sep;3(9):721-32.
18. Iio A, Waldmann TA, Strober W. Metabolic study of human IgE: evidence for an extravascular catabolic pathway. *J Immunol.* 1978 May;120(5):1696-701.

VIII Bibliografía

19. King CL, Poindexter RW, Ragunathan J, Fleisher TA, Ottesen EA, Nutman TB. Frequency analysis of IgE-secreting B lymphocytes in persons with normal or elevated serum IgE levels. *J Immunol*. 1991 Mar 1;146(5):1478-83.
20. Smurthwaite L, Durham SR. Local IgE synthesis in allergic rhinitis and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2002 May;2(3):231-8.
21. Sanz ML, Prieto I, Garcia BE, Oehling A. Diagnostic reliability considerations of specific IgE determination. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 1996 May-Jun;6(3):152-61.
22. Negrao-Correa D. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2001 Sep-Oct;43(5):291-9.
23. Bahna SL, Horwitz CA, Fiala M, Heiner DC. IgE response in heterophil-positive infectious mononucleosis. *J Allergy Clin Immunol*. 1978 Sep;62(3):167-73.
24. van Loon AM, van der Logt JT, Heessen FW, van der Veen J. Quantitation of immunoglobulin E antibody to cytomegalovirus by antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*. 1985 Apr;21(4):558-61.
25. Ringden O, Persson U, Johansson SG, Wilczek H, Gahrton G, Groth CG, et al. Markedly elevated serum IgE levels following allogeneic and syngeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1983 Jun;61(6):1190-5.
26. Poley GE, Jr., Slater JE. Latex allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Jun;105(6 Pt 1):1054-62.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

27. Turjanmaa K, Alenius H, Makinen-Kiljunen S, Reunala T, Palosuo T. Natural rubber latex allergy. *Allergy*. 1996 Sep;51(9):593-602.
28. Torres MJ, Mayorga C, Blanca-Lopez N, Blanca M. Hypersensitivity reactions to beta-lactams. *EXS*. 2014;104:165-84.
29. Sicherer SH. Manifestations of food allergy: evaluation and management. *Am Fam Physician*. 1999 Jan 15;59(2):415-24, 29-30.
30. Birnbaum J, Vervloet D, Charpin D. Atopy and systemic reactions to hymenoptera stings. *Allergy Proc*. 1994 Mar-Apr;15(2):49-52.
31. Roehr CC, Edenharter G, Reimann S, Ehlers I, Worm M, Zuberbier T, et al. Food allergy and non-allergic food hypersensitivity in children and adolescents. *Clin Exp Allergy*. 2004 Oct;34(10):1534-41.
32. Muraro MA. Diagnosis of food allergy: the oral provocation test. *Pediatr Allergy Immunol*. 2001;12 Suppl 14:31-6.
33. Sampson HA. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 May;103(5 Pt 1):717-28.
34. Sampson HA. Food allergy. Part 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Jun;103(6):981-9.
35. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, 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 Apr;63 Suppl 86:8-160.

VIII Bibliografía

36. International Consensus Report on the diagnosis and management of rhinitis. International Rhinitis Management Working Group. *Allergy*. 1994;49(19 Suppl):1-34.
37. Salib RJ, Lau LC, Howarth PH. The novel use of the human nasal epithelial cell line RPMI 2650 as an in vitro model to study the influence of allergens and cytokines on transforming growth factor-beta gene expression and protein release. *Clin Exp Allergy*. 2005 Jun;35(6):811-9.
38. Settupane RA. Rhinitis: a dose of epidemiological reality. *Allergy Asthma Proc*. 2003 May-Jun;24(3):147-54.
39. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Nov;108(5 Suppl):S147-334.
40. Ciprandi G, Cirillo I, Vizzaccaro A, Tosca M, Passalacqua G, Pallesstrini E, et al. Seasonal and perennial allergic rhinitis: is this classification adherent to real life? *Allergy*. 2005 Jul;60(7):882-7.
41. Rondon C, Romero JJ, Lopez S, Antunez C, Martin-Casanez E, Torres MJ, et al. Local IgE production and positive nasal provocation test in patients with persistent nonallergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Apr;119(4):899-905.
42. Rondon C, Dona I, Lopez S, Campo P, Romero JJ, Torres MJ, et al. Seasonal idiopathic rhinitis with local inflammatory response and specific IgE in absence of systemic response. *Allergy*. 2008 Oct;63(10):1352-8.
43. Powe DG, Huskisson RS, Carney AS, Jenkins D, Jones NS. Evidence for an inflammatory pathophysiology in idiopathic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2001 Jun;31(6):864-72.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

44. Powe DG, Huskisson RS, Carney AS, Jenkins D, McEuen AR, Walls AF, et al. Mucosal T-cell phenotypes in persistent atopic and nonatopic rhinitis show an association with mast cells. *Allergy*. 2004 Feb;59(2):204-12.
45. Rondon C, Fernandez J, Lopez S, Campo P, Dona I, Torres MJ, et al. Nasal inflammatory mediators and specific IgE production after nasal challenge with grass pollen in local allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Nov;124(5):1005-11 e1.
46. Rondon C, Fernandez J, Canto G, Blanca M. Local allergic rhinitis: concept, clinical manifestations, and diagnostic approach. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20(5):364-71; quiz 2 p following 71.
47. Stelmaszczyk-Emmel A, Zawadzka-Krajewska A, Glodkowska-Mrowka E, Demkow U. FoxP3 Tregs Response to Sublingual Allergen Specific Immunotherapy in Children Depends on the Manifestation of Allergy. *J Immunol Res*. 2015;2015:731381.
48. Strachan D, Sibbald B, Weiland S, Ait-Khaled N, Anabwani G, Anderson HR, et al. Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Pediatr Allergy Immunol*. 1997 Nov;8(4):161-76.
49. Wright AL, Holberg CJ, Martinez FD, Halonen M, Morgan W, Taussig LM. Epidemiology of physician-diagnosed allergic rhinitis in childhood. *Pediatrics*. 1994 Dec;94(6 Pt 1):895-901.
50. Sears MR, Burrows B, Herbison GP, Flannery EM, Holdaway MD. Atopy in childhood. III. Relationship with pulmonary function and airway responsiveness. *Clin Exp Allergy*. 1993 Nov;23(11):957-63.

VIII Bibliografía

51. Gregory C, Cifaldi M, Tanner LA. Targeted intervention programs: creating a customized practice model to improve the treatment of allergic rhinitis in a managed care population. *Am J Manag Care*. 1999 Apr;5(4):485-96.
52. Asher MI, Weiland SK. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). ISAAC Steering Committee. *Clin Exp Allergy*. 1998 Nov;28 Suppl 5:52-66; discussion 90-1.
53. SEAIC. Factores Epimiológicos, Clínicos y Socioeconómicos de las Enfermedades Alérgicas en España 2005.
54. Ulrik CS, von Linstow ML, Backer V. Prevalence and predictors of rhinitis in Danish children and adolescents. *Allergy*. 2000 Nov;55(11):1019-24.
55. Barnes KC, Freidhoff LR, Nickel R, Chiu YF, Juo SH, Hizawa N, et al. Dense mapping of chromosome 12q13.12-q23.3 and linkage to asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Aug;104(2 Pt 1):485-91.
56. Blumenthal M, Marcus-Bagley D, Awdeh Z, Johnson B, Yunis EJ, Alper CA. HLA-DR2, [HLA-B7, SC31, DR2], and [HLA-B8, SC01, DR3] haplotypes distinguish subjects with asthma from those with rhinitis only in ragweed pollen allergy. *J Immunol*. 1992 Jan 15;148(2):411-6.
57. Marsh DG, Hsu SH, Roebber M, Ehrlich-Kautzky E, Freidhoff LR, Meyers DA, et al. HLA-Dw2: a genetic marker for human immune response to short ragweed pollen allergen Ra5. I. Response resulting primarily from natural antigenic exposure. *J Exp Med*. 1982 May 01;155(5):1439-51.
58. Huang SK, Yi M, Palmer E, Marsh DG. A dominant T cell receptor beta-chain in response to a short ragweed allergen, Amb a 5. *J Immunol*. 1995 Jun 01;154(11):6157-62.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

59. Sandford AJ, Shirakawa T, Moffatt MF, Daniels SE, Ra C, Faux JA, et al. Localisation of atopy and beta subunit of high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on chromosome 11q. *Lancet*. 1993 Feb 06;341(8841):332-4.
60. Strachan DP. Is allergic disease programmed in early life? *Clin Exp Allergy*. 1994 Jul;24(7):603-5.
61. Braback L, Hedberg A. Perinatal risk factors for atopic disease in conscripts. *Clin Exp Allergy*. 1998 Aug;28(8):936-42.
62. Boulet LP, Turcotte H, Laprise C, Lavertu C, Bedard PM, Lavoie A, et al. Comparative degree and type of sensitization to common indoor and outdoor allergens in subjects with allergic rhinitis and/or asthma. *Clin Exp Allergy*. 1997 Jan;27(1):52-9.
63. Frosh AC, Sandhu G, Joyce R, Strachan DP. Prevalence of rhinitis, pillow type and past and present ownership of furred pets. *Clin Exp Allergy*. 1999 Apr;29(4):457-60.
64. Hesselmar B, Aberg N, Aberg B, Eriksson B, Bjorksten B. Does early exposure to cat or dog protect against later allergy development? *Clin Exp Allergy*. 1999 May;29(5):611-7.
65. Platts-Mills JA, Custis NJ, Woodfolk JA, Platts-Mills TA. Airborne endotoxin in homes with domestic animals: implications for cat-specific tolerance. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Aug;116(2):384-9.
66. Charpin D, Sibbald B, Weeke E, Wuthrich B. Epidemiologic identification of allergic rhinitis. *Allergy*. 1996 May;51(5):293-8.

VIII Bibliografía

67. Gergen PJ, Turkeltaub PC, Kramer RA. Age of onset in childhood asthma: data from a national cohort. *Ann Allergy*. 1992 Jun;68(6):507-14.
68. von Mutius E, Martinez FD, Fritzsche C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Feb;149(2 Pt 1):358-64.
69. Behrendt H, Becker WM, Fritzsche C, Sliwa-Tomczok W, Tomczok J, Friedrichs KH, et al. Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997 May-Jul;113(1-3):69-74.
70. Molfino NA, Slutsky AS, Zamel N. The effects of air pollution on allergic bronchial responsiveness. *Clin Exp Allergy*. 1992 Jul;22(7):667-72.
71. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989 Nov 18;299(6710):1259-60.
72. McLoughlin RM, Mills KH. Influence of gastrointestinal commensal bacteria on the immune responses that mediate allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 May;127(5):1097-107; quiz 108-9.
73. Gillam SJ, Jarman B, White P, Law R. Ethnic differences in consultation rates in urban general practice. *BMJ*. 1989 Oct 14;299(6705):953-7.
74. Weiland SK, Stolpe S, Keil U. [Smoking among children and adolescents: a challenge for primary prevention]. *Soz Praventivmed*. 1994;39(5):293-8.
75. Annesi-Maesano I, Oryszczyn MP, Neukirch F, Kauffmann F. Relationship of upper airway disease to tobacco smoking and allergic markers:

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

a cohort study of men followed up for 5 years. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997 Oct;114(2):193-201.

76. Jarvis D, Luczynska C, Chinn S, Burney P. The association of age, gender and smoking with total IgE and specific IgE. *Clin Exp Allergy*. 1995 Nov;25(11):1083-91.

77. Jarvis D, Chinn S, Luczynska C, Burney P. The association of smoking with sensitization to common environmental allergens: results from the European Community Respiratory Health Survey. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Nov;104(5):934-40.

78. Carney AS, Powe DG, Huskisson RS, Jones NS. Atypical nasal challenges in patients with idiopathic rhinitis: more evidence for the existence of allergy in the absence of atopy? *Clin Exp Allergy*. 2002 Oct;32(10):1436-40.

79. Lopez S, Rondon C, Torres MJ, Campo P, Canto G, Fernandez R, et al. Immediate and dual response to nasal challenge with *Dermatophagoides pteronyssinus* in local allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2010 Jul;40(7):1007-14.

80. Rondon C, Dona I, Torres MJ, Campo P, Blanca M. Evolution of patients with nonallergic rhinitis supports conversion to allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 May;123(5):1098-102.

81. Wedback A, Enbom H, Eriksson NE, Moverare R, Malcus I. Seasonal non-allergic rhinitis (SNAR)--a new disease entity? A clinical and immunological comparison between SNAR, seasonal allergic rhinitis and persistent non-allergic rhinitis. *Rhinology*. 2005 Jun;43(2):86-92.

VIII Bibliografía

82. Canonica GW, Ciprandi G, Buscaglia S, Pesce G, Bagnasco M. Adhesion molecules of allergic inflammation: recent insights into their functional roles. *Allergy*. 1994 Mar;49(3):135-41.
83. Baroody FM, Ford S, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, Naclerio RM. Physiologic responses and histamine release after nasal antigen challenge. Effect of atropine. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Jun;149(6):1457-65.
84. Lebel B, Bousquet J, Morel A, Chanal I, Godard P, Michel FB. Correlation between symptoms and the threshold for release of mediators in nasal secretions during nasal challenge with grass-pollen grains. *J Allergy Clin Immunol*. 1988 Nov;82(5 Pt 1):869-77.
85. Naclerio RM, Meier HL, Kagey-Sobotka A, Adkinson NF, Jr., Meyers DA, Norman PS, et al. Mediator release after nasal airway challenge with allergen. *Am Rev Respir Dis*. 1983 Oct;128(4):597-602.
86. Holmberg K, Bake B, Pipkorn U. Nasal mucosal blood flow after intranasal allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol*. 1988 Mar;81(3):541-7.
87. Mullol J, Rieves RD, Baraniuk JN, Lundgren JD, Merida M, Hausfeld JH, et al. The effects of neuropeptides on mucous glycoprotein secretion from human nasal mucosa in vitro. *Neuropeptides*. 1992 Apr;21(4):231-8.
88. Villajos S-G. Patogenia de la rinitis alérgica. In: Álvaro JMN, editor. *Rinitis Alérgica: Mecanismos y tratamiento*. 2 ed: MRA ediciones; 2004. p. 153-63.
89. Christodoulopoulos P, Cameron L, Durham S, Hamid Q. Molecular pathology of allergic disease. II: Upper airway disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Feb;105(2 Pt 1):211-23.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

90. Klementsson H. Eosinophils and the pathophysiology of allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 1992 Dec;22(12):1058-64.

91. Iliopoulos O, Baroody FM, Naclerio RM, Bochner BS, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Histamine-containing cells obtained from the nose hours after antigen challenge have functional and phenotypic characteristics of basophils. *J Immunol*. 1992 Apr 01;148(7):2223-8.

92. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245-52.

93. Steinman RM, Hawiger D, Liu K, Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, et al. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Apr;987:15-25.

94. Min B. Basophils: what they 'can do' versus what they 'actually do'. *Nat Immunol*. 2008 Dec;9(12):1333-9.

95. Brunner T, Heusser CH, Dahinden CA. Human peripheral blood basophils primed by interleukin 3 (IL-3) produce IL-4 in response to immunoglobulin E receptor stimulation. *J Exp Med*. 1993 Mar 01;177(3):605-11.

96. Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Conrad DH, Clark-Lewis I, Finkelman FD, Plaut M, et al. IL-3 promotes production of IL-4 by splenic non-B, non-T cells in response to Fc receptor cross-linkage. *J Immunol*. 1990 Oct 15;145(8):2500-6.

97. Schroeder JT, MacGlashan DW, Jr., Lichtenstein LM. Human basophils: mediator release and cytokine production. *Adv Immunol*. 2001;77:93-122.

98. Paul WE. Interleukin-4 production by Fc epsilon R+ cells. *Skin Pharmacol*. 1991;4 Suppl 1:8-14.

VIII Bibliografía

99. Pawankar RU, Okuda M, Okubo K, Ra C. Lymphocyte subsets of the nasal mucosa in perennial allergic rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Dec;152(6 Pt 1):2049-58.
100. KleinJan A, McEuen AR, Dijkstra MD, Buckley MG, Walls AF, Fokkens WJ. Basophil and eosinophil accumulation and mast cell degranulation in the nasal mucosa of patients with hay fever after local allergen provocation. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Oct;106(4):677-86.
101. Jira M, Antosova E, Vondra V, Strejcek J, Mazakova H, Prazakova J. Natural killer and interleukin-2 induced cytotoxicity in asthmatics. I. Effect of acute antigen-specific challenge. *Allergy*. 1988 May;43(4):294-8.
102. Timonen T, Stenius-Aarniala B. Natural killer cell activity in asthma. *Clin Exp Immunol*. 1985 Jan;59(1):85-90.
103. Balato A, Unutmaz D, Gaspari AA. Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *J Invest Dermatol*. 2009 Jul;129(7):1628-42.
104. Chen H, Paul WE. Cultured NK1.1+ CD4+ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1. *J Immunol*. 1997 Sep 01;159(5):2240-9.
105. Kamath AT, Sheasby CE, Tough DF. Dendritic cells and NK cells stimulate bystander T cell activation in response to TLR agonists through secretion of IFN-alpha beta and IFN-gamma. *J Immunol*. 2005 Jan 15;174(2):767-76.
106. Gray JD, Horwitz DA. Activated human NK cells can stimulate resting B cells to secrete immunoglobulin. *J Immunol*. 1995 Jun 01;154(11):5656-64.



Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

107. Weninger W, Crowley MA, Manjunath N, von Andrian UH. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *J Exp Med*. 2001 Oct 01;194(7):953-66.

108. Masopust D, Vezys V, Usherwood EJ, Cauley LS, Olson S, Marzo AL, et al. Activated primary and memory CD8 T cells migrate to nonlymphoid tissues regardless of site of activation or tissue of origin. *J Immunol*. 2004 Apr 15;172(8):4875-82.

109. Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD, et al. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity*. 1998 Feb;8(2):177-87.

110. Busch DH, Pilip IM, Vijn S, Pamer EG. Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity*. 1998 Mar;8(3):353-62.

111. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2002 Apr;2(4):251-62.

112. Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity*. 2003 Nov;19(5):641-4.

113. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:685-711.

114. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):987-95.

VIII Bibliografía

115. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*. 2007 Mar;7(3):179-90.
116. Lugo-Villarino G, Maldonado-Lopez R, Possemato R, Penaranda C, Glimcher LH. T-bet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific T cell activation by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 24;100(13):7749-54.
117. Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, et al. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 2002 Jun;3(6):549-57.
118. Lazarevic V, Chen X, Shim JH, Hwang ES, Jang E, Bolm AN, et al. T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding RORgammat. *Nat Immunol*. 2011 Jan;12(1):96-104.
119. Mayorga C, Pena RR, Blanca-Lopez N, Lopez S, Martin E, Torres MJ. Monitoring the acute phase response in non-immediate allergic drug reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006 Aug;6(4):249-57.
120. Torres MJ, Mayorga C, Fernandez TD, Cornejo-Garcia JA, Antunez C, Valenzuela M, et al. T cell assessment in allergic drug reactions during the acute phase according to the time of occurrence. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2006 Jan-Mar;19(1):119-30.
121. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*. 1996 Mar;4(3):313-9.
122. Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev*. 2000 Jul 15;14(14):1693-711.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

123. Zhu J, Guo L, Watson CJ, Hu-Li J, Paul WE. Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J Immunol.* 2001 Jun 15;166(12):7276-81.
124. Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res.* 2006 Jan;16(1):3-10.
125. Zhu J, Min B, Hu-Li J, Watson CJ, Grinberg A, Wang Q, et al. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat Immunol.* 2004 Nov;5(11):1157-65.
126. Pai SY, Truitt ML, Ho IC. GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Feb 17;101(7):1993-8.
127. Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Apr;119(4):780-91.
128. Akdis M. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. *Curr Opin Immunol.* 2006 Dec;18(6):738-44.
129. Larche M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2006 Oct;6(10):761-71.
130. Berin MC, Shreffler WG. T(H)2 adjuvants: implications for food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Jun;121(6):1311-20; quiz 21-2.

VIII Bibliografía

131. Chatila TA, Li N, Garcia-Lloret M, Kim HJ, Nel AE. T-cell effector pathways in allergic diseases: transcriptional mechanisms and therapeutic targets. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Apr;121(4):812-23; quiz 24-5.
132. Kang CM, Jang AS, Ahn MH, Shin JA, Kim JH, Choi YS, et al. Interleukin-25 and interleukin-13 production by alveolar macrophages in response to particles. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 Sep;33(3):290-6.
133. Wang YH, Angkasekwinai P, Lu N, Voo KS, Arima K, Hanabuchi S, et al. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med*. 2007 Aug 06;204(8):1837-47.
134. Dillon SR, Sprecher C, Hammond A, Bilsborough J, Rosenfeld-Franklin M, Presnell SR, et al. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol*. 2004 Jul;5(7):752-60.
135. Bilsborough J, Leung DY, Maurer M, Howell M, Boguniewicz M, Yao L, et al. IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Feb;117(2):418-25.
136. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Oct;7(10):827-40.
137. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol*. 2008 Dec;9(12):1347-55.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

138. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol.* 2008 Dec;9(12):1341-6.

139. Staudt V, Bothur E, Klein M, Lingnau K, Reuter S, Grebe N, et al. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity.* 2010 Aug 27;33(2):192-202.

140. Umezu-Goto M, Kajiyama Y, Kobayashi N, Kaminuma O, Suko M, Mori A. IL-9 production by peripheral blood mononuclear cells of atopic asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;143 Suppl 1:76-9.

141. Erpenbeck VJ, Hohlfeld JM, Volkmann B, Hagenberg A, Geldmacher H, Braun A, et al. Segmental allergen challenge in patients with atopic asthma leads to increased IL-9 expression in bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Jun;111(6):1319-27.

142. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006 Feb;24(2):179-89.

143. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature.* 2006 May 11;441(7090):231-4.

144. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006 May 11;441(7090):235-8.

VIII Bibliografía

145. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR γ . *Nat Immunol.* 2008 Jun;9(6):641-9.
146. Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupe P, Barillot E, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol.* 2008 Jun;9(6):650-7.
147. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003 Dec 15;198(12):1875-86.
148. Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov, II, Min R, Victora GD, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR γ function. *Nature.* 2008 May 08;453(7192):236-40.
149. Burgler S, Ouaked N, Bassin C, Basinski TM, Mantel PY, Siegmund K, et al. Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Mar;123(3):588-95, 95 e1-7.
150. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, et al. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature.* 2007 Feb 08;445(7128):648-51.
151. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1133-41.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

152. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1123-32.
153. Makihara S, Okano M, Fujiwara T, Kariya S, Noda Y, Higaki T, et al. Regulation and characterization of IL-17A expression in patients with chronic rhinosinusitis and its relationship with eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Aug;126(2):397-400, e1-11.
154. Martin P, Gomez M, Lamana A, Matesanz Marin A, Cortes JR, Ramirez-Huesca M, et al. The leukocyte activation antigen CD69 limits allergic asthma and skin contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Aug;126(2):355-65, 65 e1-3.
155. Sergejeva S, Ivanov S, Lotvall J, Linden A. Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005 Sep;33(3):248-53.
156. Hellings PW, Kasran A, Liu Z, Vandekerckhove P, Wuyts A, Overbergh L, et al. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Jan;28(1):42-50.
157. Robinson DS, Larche M, Durham SR. Tregs and allergic disease. *J Clin Invest.* 2004 Nov;114(10):1389-97.
158. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev.* 2001 Aug;182:68-79.

VIII Bibliografía

159. Romagnani S. Regulatory T cells: which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders? *Allergy*. 2006 Jan;61(1):3-14.
160. Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol*. 2004 Nov;4(11):841-55.
161. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995 Aug 01;155(3):1151-64.
162. Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+ CD25+ T cells. *Clin Immunol*. 2005 Apr;115(1):10-8.
163. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2000 Jul 17;192(2):295-302.
164. Ronchetti S, Zollo O, Bruscoli S, Agostini M, Bianchini R, Nocentini G, et al. GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol*. 2004 Mar;34(3):613-22.
165. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):503-13.
166. Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic disregulation syndrome. *J Clin Invest*. 2000 Dec;106(12):R75-81.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

167. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med*. 2006 Jul 10;203(7):1701-11.

168. Yu N, Li X, Song W, Li D, Yu D, Zeng X, et al. CD4(+)CD25 (+)CD127 (low/-) T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood. *Inflammation*. 2012 Dec;35(6):1773-80.

169. Kashyap M, Thornton AM, Norton SK, Barnstein B, Macey M, Brenzovich J, et al. Cutting edge: CD4 T cell-mast cell interactions alter IgE receptor expression and signaling. *J Immunol*. 2008 Feb 15;180(4):2039-43.

170. Ring S, Schafer SC, Mahnke K, Lehr HA, Enk AH. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *Eur J Immunol*. 2006 Nov;36(11):2981-92.

171. Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy*. 2008 Nov;63(11):1455-63.

172. Sakaguchi S, Wing K, Yamaguchi T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *Eur J Immunol*. 2009 Sep;39(9):2331-6.

173. Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol*. 2011 Dec;23(6):424-30.

174. Akdis CA, Joss A, Akdis M, Faith A, Blaser K. A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28

tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding. *FASEB J.* 2000 Sep;14(12):1666-8.

175. Taylor A, Verhagen J, Akkoc T, Wenig R, Flory E, Blaser K, et al. IL-10 suppresses CD2-mediated T cell activation via SHP-1. *Mol Immunol.* 2009 Feb;46(4):622-9.

176. Taylor A, Akdis M, Joss A, Akkoc T, Wenig R, Colonna M, et al. IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Jul;120(1):76-83.

177. Hellings PW, Vandenberghe P, Kasran A, Coorevits L, Overbergh L, Mathieu C, et al. Blockade of CTLA-4 enhances allergic sensitization and eosinophilic airway inflammation in genetically predisposed mice. *Eur J Immunol.* 2002 Feb;32(2):585-94.

178. Tonegawa S. [Molecular biology of immunologic recognition]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 1987 Mar;32(3):239-50.

179. Melchers F. The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nat Rev Immunol.* 2005 Jul;5(7):578-84.

180. ten Boekel E, Melchers F, Rolink AG. Precursor B cells showing H chain allelic inclusion display allelic exclusion at the level of pre-B cell receptor surface expression. *Immunity.* 1998 Feb;8(2):199-207.

181. Chung JB, Silverman M, Monroe JG. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol.* 2003 Jun;24(6):343-9.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

182. Mei HE, Yoshida T, Muehlinghaus G, Hiepe F, Dorner T, Radbruch A, et al. Phenotypic analysis of B-cells and plasma cells. *Methods Mol Med.* 2007;136:3-18.

183. Moser K, Muehlinghaus G, Manz R, Mei H, Voigt C, Yoshida T, et al. Long-lived plasma cells in immunity and immunopathology. *Immunol Lett.* 2006 Mar 15;103(2):83-5.

184. Hauser AE, Muehlinghaus G, Manz RA, Cassese G, Arce S, Debes GF, et al. Long-lived plasma cells in immunity and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Apr;987:266-9.

185. Hauser AE, Debes GF, Arce S, Cassese G, Hamann A, Radbruch A, et al. Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J Immunol.* 2002 Aug 01;169(3):1277-82.

186. Weinstein E, Peeva E, Putterman C, Diamond B. B-cell biology. *Rheum Dis Clin North Am.* 2004 Feb;30(1):159-74.

187. Winter O, Dame C, Jundt F, Hiepe F. Pathogenic long-lived plasma cells and their survival niches in autoimmunity, malignancy, and allergy. *J Immunol.* 2012 Dec 01;189(11):5105-11.

188. Cassese G, Arce S, Hauser AE, Lehnert K, Moewes B, Mostarac M, et al. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol.* 2003 Aug 15;171(4):1684-90.

189. Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, Jacobi AM, Hansen A, Muehlinghaus G, et al. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization

of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1614-21.

190. Fernandez TD, Torres MJ, Blanca-Lopez N, Rodriguez-Bada JL, Gomez E, Canto G, et al. Negativization rates of IgE radioimmunoassay and basophil activation test in immediate reactions to penicillins. *Allergy*. 2009 Feb;64(2):242-8.

191. Romagnani S. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Mar;113(3):395-400.

192. Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim HP, Wang G, Qi CF, et al. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol*. 2004 Nov 01;173(9):5361-71.

193. Turner CA, Jr., Mack DH, Davis MM. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell*. 1994 Apr 22;77(2):297-306.

194. Lin KI, Tunyaplin C, Calame K. Transcriptional regulatory cascades controlling plasma cell differentiation. *Immunol Rev*. 2003 Aug;194:19-28.

195. Lee SJ, Noh G, Lee JH. In Vitro Induction of Allergen-Specific Interleukin-10-Producing Regulatory B Cell Responses by Interferon-gamma in Non-Immunoglobulin E-Mediated Milk Allergy. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2013 Jan;5(1):48-54.

196. Noh J, Noh G, Lee SJ, Lee JH, Kim A, Kim HS, et al. Tolerogenic effects of interferon-gamma with induction of allergen-specific interleukin-10-producing regulatory B cell (Br1) changes in non-IgE-mediated food allergy. *Cell Immunol*. 2012;273(2):140-9.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

197. van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Sollner S, Akdis DG, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Apr;131(4):1204-12.
198. Berthelot JM, Jamin C, Amrouche K, Le Goff B, Maugars Y, Youinou P. Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Joint Bone Spine*. 2013 Jan;80(1):18-22.
199. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med*. 1999 Oct 4;190(7):995-1004.
200. Huby RD, Dearman RJ, Kimber I. Why are some proteins allergens? *Toxicol Sci*. 2000 Jun;55(2):235-46.
201. Comoy EE, Pestel J, Duez C, Stewart GA, Vendeville C, Fournier C, et al. The house dust mite allergen, *Dermatophagoides pteronyssinus*, promotes type 2 responses by modulating the balance between IL-4 and IFN-gamma. *J Immunol*. 1998 Mar 01;160(5):2456-62.
202. Stewart GA, Thompson PJ. The biochemistry of common aeroallergens. *Clin Exp Allergy*. 1996 Sep;26(9):1020-44.
203. Bufe A, Spangfort MD, Kahlert H, Schlaak M, Becker WM. The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. *Planta*. 1996;199(3):413-5.
204. Mahoney NM, Janmey PA, Almo SC. Structure of the profilin-poly-L-proline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation. *Nat Struct Biol*. 1997 Nov;4(11):953-60.

VIII Bibliografía

205. Stewart GA, Robinson C. The immunobiology of allergenic peptidases. *Clin Exp Allergy*. 2003 Jan;33(1):3-6.
206. GSCHMEISSNER S. Pollen grain, SEM. 2013; Available from: www.sciencephoto.com.
207. Bousquet J, Guerin B, Hewitt B, Lim S, Michel FB. Allergy in the Mediterranean area. III: Cross reactivity among Oleaceae pollens. *Clin Allergy*. 1985 Sep;15(5):439-48.
208. D'Amato G, Lobefalo G. Allergenic pollens in the southern Mediterranean area. *J Allergy Clin Immunol*. 1989 Jan;83(1):116-22.
209. D'Amato G, Cecchi L, Bonini S, Nunes C, Annesi-Maesano I, Behrendt H, et al. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy*. 2007 Sep;62(9):976-90.
210. Bush RK, Portnoy JM. The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Mar;107(3 Suppl):S430-40.
211. Kuna P, Kaczmarek J, Kupczyk M. Efficacy and safety of immunotherapy for allergies to *Alternaria alternata* in children. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Feb;127(2):502-8 e1-6.
212. Spiekma FT. Domestic mites from an acarologic perspective. *Allergy*. 1997 Apr;52(4):360-8.
213. www.allergen.org.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

214. Hong CS, Lee MK, Oh SH. Identification of major allergens from the house dust mites, *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus*, by electroblotting. *Yonsei Med J.* 1991 Mar;32(1):24-32.

215. Pernas M, Sanchez-Ramos I, Sanchez-Monge R, Lombardero M, Arteaga C, Castanera P, et al. Der p 1 and Der f 1, the highly related and major allergens from house dust mites, are differentially affected by a plant cystatin. *Clin Exp Allergy.* 2000 Jul;30(7):972-8.

216. Lau S, Falkenhorst G, Weber A, Werthmann I, Lind P, Buettner-Goetz P, et al. High mite-allergen exposure increases the risk of sensitization in atopic children and young adults. *J Allergy Clin Immunol.* 1989 Nov;84(5 Pt 1):718-25.

217. Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TA, Cogswell JJ. Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. A prospective study. *N Engl J Med.* 1990 Aug 23;323(8):502-7.

218. Campo P, Salas M, Blanca-Lopez N, Rondon C. Local Allergic Rhinitis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2016 May;36(2):321-32.

219. Gomez F, Rondon C, Salas M, Campo P. Local allergic rhinitis: mechanisms, diagnosis and relevance for occupational rhinitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2015 Apr;15(2):111-6.

220. Dordal MT, Lluch-Bernal M, Sanchez MC, Rondon C, Navarro A, Montoro J, et al. Allergen-specific nasal provocation testing: review by the rhinoconjunctivitis committee of the Spanish Society of Allergy and Clinical Immunology. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2011;21(1):1-12; quiz follow

VIII Bibliografía

221. Pirila T, Nuutinen J. Acoustic rhinometry, rhinomanometry and the amount of nasal secretion in the clinical monitoring of the nasal provocation test. *Clin Exp Allergy*. 1998 Apr;28(4):468-77.
222. Scadding GK, Darby YC, Austin CE. Acoustic rhinometry compared with anterior rhinomanometry in the assessment of the response to nasal allergen challenge. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1994 Oct;19(5):451-4.
223. Dykewicz MS, Fineman S. Executive Summary of Joint Task Force Practice Parameters on Diagnosis and Management of Rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1998 Nov;81(5 Pt 2):463-8.
224. Gendo K, Larson EB. Evidence-based diagnostic strategies for evaluating suspected allergic rhinitis. *Ann Intern Med*. 2004 Feb 17;140(4):278-89.
225. Sampson HA, Broadbent KR, Bernhisel-Broadbent J. Spontaneous release of histamine from basophils and histamine-releasing factor in patients with atopic dermatitis and food hypersensitivity. *N Engl J Med*. 1989 Jul 27;321(4):228-32.
226. Gomez E, Blanca-Lopez N, Torres MJ, Requena G, Rondon C, Canto G, et al. Immunoglobulin E-mediated immediate allergic reactions to dipyrone: value of basophil activation test in the identification of patients. *Clin Exp Allergy*. 2009 Aug;39(8):1217-24.
227. Nopp A, Cardell LO, Johansson SG. CD-sens can be a reliable and easy-to-use complement in the diagnosis of allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;161(1):87-90.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

228. MacGlashan D, Jr. Expression of CD203c and CD63 in human basophils: relationship to differential regulation of piecemeal and anaphylactic degranulation processes. *Clin Exp Allergy*. 2010 Sep;40(9):1365-77.
229. Moneret-Vautrin DA, Sainte-Laudy J, Kanny G, Fremont S. Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1999 Jan;82(1):33-40.
230. Mayorga C, Gomez F, Aranda A, Koppelman SJ, Diaz-Perales A, Blanca-Lopez N, et al. Basophil response to peanut allergens in Mediterranean peanut-allergic patients. *Allergy*. 2014 Jul;69(7):964-8.
231. Wolanczyk-Medrala A, Gogolewski G, Liebhart J, Gomulka K, Litwa M, Panaszek B, et al. A new variant of the basophil activation test for allergen-induced basophil CD63 upregulation. The effect of cetirizine. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19(6):465-73.
232. Campo P, Villalba M, Barrionuevo E, Rondon C, Salas M, Galindo L, et al. Immunologic responses to the major allergen of *Olea europaea* in local and systemic allergic rhinitis subjects. *Clin Exp Allergy*. 2015 Nov;45(11):1703-12.
233. Gomez E, Campo P, Rondon C, Barrionuevo E, Blanca-Lopez N, Torres MJ, et al. Role of the basophil activation test in the diagnosis of local allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Oct;132(4):975-6 e1-5.
234. Ciprandi G, Buscaglia S, Pesce G, Pronzato C, Ricca V, Parmiani S, et al. Minimal persistent inflammation is present at mucosal level in patients with asymptomatic rhinitis and mite allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1995 Dec;96(6 Pt 1):971-9.

VIII Bibliografía

235. Sheikh A, Hurwitz B. House dust mite avoidance measures for perennial allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2001(4):CD001563.
236. Terreehorst I, Hak E, Oosting AJ, Tempels-Pavlica Z, de Monchy JG, Bruijnzeel-Koomen CA, et al. Evaluation of impermeable covers for bedding in patients with allergic rhinitis. *N Engl J Med*. 2003 Jul 17;349(3):237-46.
237. Warner JA, Marchant JL, Warner JO. Allergen avoidance in the homes of atopic asthmatic children: the effect of Allersearch DMS. *Clin Exp Allergy*. 1993 Apr;23(4):279-86.
238. Church MK SJ, Sampson AP. Mast-cell derived mediators. Mast-cell derived mediators. Adkinson NF YJBW, Bochner BS, GHolgate ST, Simons FER, editor2003.
239. Holm AF, Fokkens WJ, Godthelp T, Mulder PG, Vroom TM, Rijntjes E. Effect of 3 months' nasal steroid therapy on nasal T cells and Langerhans cells in patients suffering from allergic rhinitis. *Allergy*. 1995 Mar;50(3):204-9.
240. Rak S, Jacobson MR, Sudderick RM, Masuyama K, Juliusson S, Kay AB, et al. Influence of prolonged treatment with topical corticosteroid (fluticasone propionate) on early and late phase nasal responses and cellular infiltration in the nasal mucosa after allergen challenge. *Clin Exp Allergy*. 1994 Oct;24(10):930-9.
241. Holgate ST, Djukanovic R, Casale T, Bousquet J. Anti-immunoglobulin E treatment with omalizumab in allergic diseases: an update on anti-inflammatory activity and clinical efficacy. *Clin Exp Allergy*. 2005 Apr;35(4):408-16.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

242. Vickery BP, Scurlock AM, Jones SM, Burks AW. Mechanisms of immune tolerance relevant to food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Mar;127(3):576-84; quiz 85-6.

243. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, et al. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med.* 2004 Jun 7;199(11):1567-75.

244. Antunez C, Mayorga C, Corzo JL, Jurado A, Torres MJ. Two year follow-up of immunological response in mite-allergic children treated with sublingual immunotherapy. Comparison with subcutaneous administration. *Pediatr Allergy Immunol.* 2008 May;19(3):210-8.

245. Ebner 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 Phl p 1, a major grass pollen allergen. *Clin Exp Allergy.* 1997 Sep;27(9):1007-15.

246. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organ J.* 2015;8(1):17.

247. Jutel M, Agache I, Bonini S, Burks AW, Calderon M, Canonica W, et al. International consensus on allergy immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Sep;136(3):556-68.

248. Novembre E, Galli E, Landi F, Caffarelli C, Pifferi M, De Marco E, et al. Coseasonal sublingual immunotherapy reduces the development of asthma in children with allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Oct;114(4):851-7.

VIII Bibliografía

249. Marogna M, Spadolini I, Massolo A, Canonica GW, Passalacqua G. Randomized controlled open study of sublingual immunotherapy for respiratory allergy in real-life: clinical efficacy and more. *Allergy*. 2004 Nov;59(11):1205-10.
250. Ross RN, Nelson HS, Finegold I. Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis: an analysis of randomized, prospective, single- or double-blind, placebo-controlled studies. *Clin Ther*. 2000 Mar;22(3):342-50.
251. Wilson DR, Torres LI, Durham SR. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003(2):CD002893.
252. Rosewich M, Arendt S, El Moussaoui S, Schulze J, Schubert R, Zielen S. Bronchial allergen provocation: a useful method to assess the efficacy of specific immunotherapy in children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2013 Aug;24(5):434-40.
253. Tversky JR, Bieneman AP, Chichester KL, Hamilton RG, Schroeder JT. Subcutaneous allergen immunotherapy restores human dendritic cell innate immune function. *Clin Exp Allergy*. 2010 Jan;40(1):94-102.
254. Jay DC, Nadeau KC. Immune mechanisms of sublingual immunotherapy. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014 Nov;14(11):473.
255. Bohle 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 Sep;120(3):707-13.
256. Suarez-Fueyo A, Ramos T, Galan A, Jimeno L, Wurtzen PA, Marin A, et al. Grass tablet sublingual immunotherapy downregulates the TH2 cytokine

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

response followed by regulatory T-cell generation. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Jan;133(1):130-8 e1-2.

257. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Apr;123(4):735-46; quiz 47-8.

258. Jutel M, Agache I, Bonini S, Burks AW, Calderon M, Canonica W, et al. International Consensus on Allergen Immunotherapy II: Mechanisms, standardization, and pharmacoeconomics. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Feb;137(2):358-68.

259. Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Nov;116(5):961-8; quiz 9.

260. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Mar;127(3):701-21 e1-70.

261. Shamji MH, James LK, Durham SR. Serum immunologic markers for monitoring allergen-specific immunotherapy. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2011 May;31(2):311-23, x.

262. Narisety SD, Frischmeyer-Guerrero PA, Keet CA, Gorelik M, Schroeder J, Hamilton RG, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of sublingual versus oral immunotherapy for the treatment of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 May;135(5):1275-82 e1-6.

263. Fernandez-Rivas M, Garrido Fernandez S, Nadal JA, Diaz de Durana MD, Garcia BE, Gonzalez-Mancebo E, et al. Randomized double-blind, placebo-



controlled trial of sublingual immunotherapy with a Pru p 3 quantified peach extract. *Allergy*. 2009 Jun;64(6):876-83.

264. Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Jun;113(6):1025-34; quiz 35.

265. Fleischer DM, Burks AW, 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 Jan;131(1):119-27 e1-7.

266. Sin BA, Akdis M, Zumkehr J, Bezzine S, Bekpen C, Lambeau G, et al. T-cell and antibody responses to phospholipase A2 from different species show distinct cross-reactivity patterns. *Allergy*. 2011 Dec;66(12):1513-21.

267. Ozdemir C, Kucuksezer UC, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immunotherapy to wasp and bee venom. *Clin Exp Allergy*. 2011 Sep;41(9):1226-34.

268. Fujita H, Soyka MB, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clin Transl Allergy*. 2012 Jan 05;2(1):2.

269. Kulis M, Li Y, Lane H, Pons L, Burks W. Single-tree nut immunotherapy attenuates allergic reactions in mice with hypersensitivity to multiple tree nuts. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Jan;127(1):81-8.

270. Gomez F, Bogas G, Gonzalez M, Campo P, Salas M, Diaz-Perales A, et al. The clinical and immunological effects of Pru p 3 sublingual immunotherapy on peach and peanut allergy in patients with systemic reactions. *Clin Exp Allergy*. 2017 Mar;47(3):339-50.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

271. Pajno GB, Barberio G, De Luca F, Morabito L, Parmiani S. Prevention of new sensitizations in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy. A six-year follow-up study. *Clin Exp Allergy*. 2001 Sep;31(9):1392-7.

272. Herman J, Thelen N, Smargiasso N, Mailleux AC, Luxen A, Cloes M, et al. Der p 1 is the primary activator of Der p 3, Der p 6 and Der p 9 the proteolytic allergens produced by the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Mar;1840(3):1117-24.

273. Novak N, Mete N, Bussmann C, Maintz L, Bieber T, Akdis M, et al. Early suppression of basophil activation during allergen-specific immunotherapy by histamine receptor 2. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Nov;130(5):1153-8 e2.

274. Maggi E. T-cell responses induced by allergen-specific immunotherapy. *Clin Exp Immunol*. 2010 Jul 01;161(1):10-8.

275. Ewan PW, Deighton J, Wilson AB, Lachmann PJ. Venom-specific IgG antibodies in bee and wasp allergy: lack of correlation with protection from stings. *Clin Exp Allergy*. 1993 Aug;23(8):647-60.

276. Djurup R, Malling HJ. High IgG4 antibody level is associated with failure of immunotherapy with inhalant allergens. *Clin Allergy*. 1987 Sep;17(5):459-68.

277. Calderon MA, Casale TB, Nelson HS, Demoly P. An evidence-based analysis of house dust mite allergen immunotherapy: a call for more rigorous clinical studies. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Dec;132(6):1322-36.

278. Wu Z. Antigen specific immunotherapy generates CD27(+) CD35(+) tolerogenic dendritic cells. *Cell Immunol*. 2013 May-Jun;283(1-2):75-80.

VIII Bibliografía

279. Lou W, Wang C, Wang Y, Han D, Zhang L. Responses of CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) and IL-10-secreting type I T regulatory cells to cluster-specific immunotherapy for allergic rhinitis in children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2012 Mar;23(2):140-9.
280. Sorensen AE, Johnsen CR, Dalgaard LT, Wurtzen PA, Kristensen B, Larsen MH, et al. Human leukocyte antigen-G and regulatory T cells during specific immunotherapy for pollen allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;162(3):237-52.
281. Fujimura 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 Apr;139(1):65-74.
282. Thunberg S, Gafvelin G, Nord M, Gronneberg R, Grunewald J, Eklund A, et al. Allergen provocation increases TH2-cytokines and FOXP3 expression in the asthmatic lung. *Allergy.* 2010 Mar;65(3):311-8.
283. Schubert R, Eickmeier O, Garn H, Baer PC, Mueller T, Schulze J, et al. Safety and immunogenicity of a cluster specific immunotherapy in children with bronchial asthma and mite allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009;148(3):251-60.
284. Moed H, Gerth van Wijk R, Hendriks RW, van der Wouden JC. Evaluation of clinical and immunological responses: a 2-year follow-up study in children with allergic rhinitis due to house dust mite. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:345217.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

285. Kim EH, Bird JA, Kulis M, Laubach S, Pons L, Shreffler W, et al. Sublingual immunotherapy for peanut allergy: clinical and immunologic evidence of desensitization. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Mar;127(3):640-6 e1.
286. Mansson A, Bachar O, Adner M, Bjornsson S, Cardell LO. Leukocyte phenotype changes induced by specific immunotherapy in patients with birch allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20(6):476-83.
287. Fujimura T, Yonekura S, Taniguchi Y, Horiguchi S, Saito A, Yasueda H, et al. The induced regulatory T cell level, defined as the proportion of IL-10(+)Foxp3(+) cells among CD25(+)CD4(+) leukocytes, is a potential therapeutic biomarker for sublingual immunotherapy: a preliminary report. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;153(4):378-87.
288. Fernandez TD, Gomez E, Dona I, Campo P, Rondon C, Gonzalez M, et al. Differential Plasma-cell evolution is linked with *Dermatophagoides pteronyssinus* immunotherapy response. *Sci Rep*. 2015;5:14482.
289. Skoner DP. Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Jul;108(1 Suppl):S2-8.
290. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Oct;102(4 Pt 1):558-62.
291. Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003(4):CD001186.
292. Calderon MA, Alves B, Jacobson M, Hurwitz B, Sheikh A, Durham S. Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Jan 24(1):CD001936.

VIII Bibliografía

293. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, Alvarez-Cuesta E, Canonica GW, Chapman MD, et al. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1998 Nov;81(5):401-5.
294. Haugaard L, Dahl R, Jacobsen L. A controlled dose-response study of immunotherapy with standardized, partially purified extract of house dust mite: clinical efficacy and side effects. *J Allergy Clin Immunol.* 1993 Mar;91(3):709-22.
295. Griffin P, Ford AW, Alterman L, Thompson J, Parkinson C, Blainey AD, et al. Allergenic and antigenic relationship between three species of storage mite and the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol.* 1989 Jul;84(1):108-17.
296. van der Zee JS, van Swieten P, Jansen HM, Aalberse RC. Skin tests and histamine release with P1-depleted *Dermatophagoides pteronyssinus* body extracts and purified P1. *J Allergy Clin Immunol.* 1988 May;81(5 Pt 1):884-96.
297. Frew AJ, Powell RJ, Corrigan CJ, Durham SR. Efficacy and safety of specific immunotherapy with SQ allergen extract in treatment-resistant seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Feb;117(2):319-25.
298. Des Roches A, Paradis L, Menardo JL, Bouges S, Daures JP, Bousquet J. Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. *J Allergy Clin Immunol.* 1997 Apr;99(4):450-3.
299. Jacobsen L, Niggemann B, Dreborg S, Ferdousi HA, Halken S, Host A, et al. Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. *Allergy*. 2007 Aug;62(8):943-8.

300. Pfaar O, Demoly P, Gerth van Wijk R, Bonini S, Bousquet J, Canonica GW, et al. Recommendations for the standardization of clinical outcomes used in allergen immunotherapy trials for allergic rhinoconjunctivitis: an EAACI Position Paper. *Allergy*. 2014 Jul;69(7):854-67.

301. Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G, Beyer K, Bindslev-Jensen C, et al. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy*. 2014 Aug;69(8):1008-25.

302. Dreborg S. Skin testing. The safety of skin tests and the information obtained from using different methods and concentrations of allergen. *Allergy*. 1993 Oct;48(7):473-5.

303. Soares-Weiser K, Takwoingi Y, Panesar SS, Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, et al. The diagnosis of food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2014 Jan;69(1):76-86.

304. Clement PA, Gordts F. Consensus report on acoustic rhinometry and rhinomanometry. *Rhinology*. 2005 Sep;43(3):169-79.

305. Amarasekera M. Immunoglobulin E in health and disease. *Asia Pac Allergy*. 2011 Apr;1(1):12-5.

306. Gomez E, Fernandez TD, Dona I, Rondon C, Campo P, Gomez F, et al. Initial immunological changes as predictors for house dust mite immunotherapy response. *Clin Exp Allergy*. 2015 Oct;45(10):1542-53.

307. NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

308. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45.
309. Greiner AN, Hellings PW, Rotiroti G, Scadding GK. Allergic rhinitis. *Lancet.* 2011 Dec 17;378(9809):2112-22.
310. Williams DC, Edney G, Maiden B, Smith PK. Recognition of allergic conjunctivitis in patients with allergic rhinitis. *World Allergy Organ J.* 2013 Feb 12;6(1):4.
311. Maurer M, Zuberbier T. Undertreatment of rhinitis symptoms in Europe: findings from a cross-sectional questionnaire survey. *Allergy.* 2007 Sep;62(9):1057-63.
312. Passalacqua G. Specific immunotherapy: beyond the clinical scores. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2011 Nov;107(5):401-6.
313. Bauchau V, Durham SR. Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *Eur Respir J.* 2004 Nov;24(5):758-64.
314. Bousquet J, Demoly P, Michel FB. Specific immunotherapy in rhinitis and asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2001 Jul;87(1 Suppl 1):38-42.
315. Aydogan M, Mete N, Yazı D, Akkoc T, Ozdemir C, Blaser K, et al. Comparison of Der p1-specific antibody levels in children with allergic airway disease and healthy controls. *Pediatr Allergy Immunol.* 2007 Jun;18(4):320-5.
316. Meltzer EO, Bukstein DA. The economic impact of allergic rhinitis and current guidelines for treatment. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2011 Feb;106(2 Suppl):S12-6.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

317. Winther L, Arnved J, Malling HJ, Nolte H, Mosbech H. Side-effects of allergen-specific immunotherapy: a prospective multi-centre study. *Clin Exp Allergy*. 2006 Mar;36(3):254-60.

318. Francis JN, James LK, Paraskevopoulos G, Wong C, Calderon MA, Durham SR, et al. Grass pollen immunotherapy: IL-10 induction and suppression of late responses precedes IgG4 inhibitory antibody activity. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 May;121(5):1120-5 e2.

319. Mobs C, Ipsen H, Mayer L, Slotosch C, Petersen A, Wurtzen PA, et al. Birch pollen immunotherapy results in long-term loss of Bet v 1-specific TH2 responses, transient TR1 activation, and synthesis of IgE-blocking antibodies. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Nov;130(5):1108-16 e6.

320. Klunker S, Saggar LR, Seyfert-Margolis V, Asare AL, Casale TB, Durham SR, et al. Combination treatment with omalizumab and rush immunotherapy for ragweed-induced allergic rhinitis: Inhibition of IgE-facilitated allergen binding. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Sep;120(3):688-95.

321. McHugh SM, Lavelle B, Kemeny DM, Patel S, Ewan PW. A placebo-controlled trial of immunotherapy with two extracts of *Dermatophagoides pteronyssinus* in allergic rhinitis, comparing clinical outcome with changes in antigen-specific IgE, IgG, and IgG subclasses. *J Allergy Clin Immunol*. 1990 Oct;86(4 Pt 1):521-31.

322. 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 Feb;67(2):217-26.

VIII Bibliografía

323. Subbarayal B, Schiller D, Mobs C, de Jong NW, Ebner C, Reider N, et al. Kinetics, cross-reactivity, and specificity of Bet v 1-specific IgG4 antibodies induced by immunotherapy with birch pollen. *Allergy*. 2013 Nov;68(11):1377-86.
324. Gastaminza G, Algorta J, Uriel O, Audicana MT, Fernandez E, Sanz ML, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of sublingual immunotherapy in natural rubber latex allergic patients. *Trials*. 2011 Aug 09;12:191.
325. Horak F, Ziegelmayer P, Ziegelmayer R, Lemell P, Devillier P, Montagut A, 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 Sep;124(3):471-7, 7 e1.
326. Van Overtvelt L, Baron-Bodo V, Horiot S, Moussu H, Ricarte C, Horak F, et al. Changes in basophil activation during grass-pollen sublingual immunotherapy do not correlate with clinical efficacy. *Allergy*. 2011 Dec;66(12):1530-7.
327. Erzen R, Kosnik M, Silar M, Korosec P. Basophil response and the induction of a tolerance in venom immunotherapy: a long-term sting challenge study. *Allergy*. 2012 Jun;67(6):822-30.
328. Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Tokuda R, Usui T, Masuda S, et al. Allergen-induced basophil CD203c expression as a biomarker for rush immunotherapy in patients with Japanese cedar pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;146 Suppl 1:47-53.
329. Wilson DR, Irani AM, Walker SM, Jacobson MR, Mackay IS, Schwartz LB, et al. Grass pollen immunotherapy inhibits seasonal increases in basophils

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

and eosinophils in the nasal epithelium. *Clin Exp Allergy*. 2001 Nov;31(11):1705-13.

330. Brown SG, Haas MA, Black JA, Parameswaran A, Woods GM, Heddle RJ. In vitro testing to diagnose venom allergy and monitor immunotherapy: a placebo-controlled, crossover trial. *Clin Exp Allergy*. 2004 May;34(5):792-800.

331. Erdmann SM, Sachs B, Kwiecien R, Moll-Slodowy S, Sauer I, Merk HF. The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. *Allergy*. 2004 Oct;59(10):1102-9.

332. Swamy RS, Reshamwala N, Hunter T, Vissamsetti S, Santos CB, Baroody FM, et al. Epigenetic modifications and improved regulatory T-cell function in subjects undergoing dual sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jul;130(1):215-24 e7.

333. Mikkelsen S, Bibby BM, Dolberg MK, Dahl R, Hoffmann HJ. Basophil sensitivity through CD63 or CD203c is a functional measure for specific immunotherapy. *Clin Mol Allergy*. 2010 Feb 16;8(1):2.

334. Soyer OU, Akdis M, Ring J, Behrendt H, Cramer R, Lauener R, et al. Mechanisms of peripheral tolerance to allergens. *Allergy*. 2013 Feb;68(2):161-70.

335. Qu SH, Li M, Huang YJ, Ou ZY, Lin ZB, Liang JP, et al. [Effects of allergen and intranasal glucocorticoid on Th17 and RORgamma t in peripheral blood in patients with allergic rhinitis.]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2009 Dec;44(12):996-1000.

336. Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev*. 2010 Nov;238(1):247-62.

VIII Bibliografía

337. Mantel PY, Kuipers H, Boyman O, Rhyner C, Ouaked N, Ruckert B, et al. GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS Biol.* 2007 Dec;5(12):e329.
338. Torres MJ, Mayorga C, Blanca M. Nonimmediate allergic reactions induced by drugs: pathogenesis and diagnostic tests. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2009;19(2):80-90.
339. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.
340. Pevec B, Radulovic Pevec M, Stipic Markovic A, Batista I, Rijavec M, Silar M, et al. House dust mite-specific immunotherapy alters the basal expression of T regulatory and FcepsilonRI pathway genes. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;159(3):287-96.
341. Li Q, He J, Zhuang X, Yang X, Zhu J, Xie T, et al. [The comparative study of lymph node dissection by video-assisted thoracoscopic surgery (VATS) and conventional lateral incision surgery]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2010 Dec;13(12):1141-4.
342. Rolland JM, Gardner LM, O'Hehir RE. Functional regulatory T cells and allergen immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2010 Dec;10(6):559-66.
343. Cosmi L, Santarlasci 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-gamma- and interleukin-10-production. *Clin Exp Allergy.* 2006 Mar;36(3):261-72.

Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

344. Yao W, Tepper RS, Kaplan MH. Predisposition to the development of IL-9-secreting T cells in atopic infants. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Dec;128(6):1357-60 e5.

345. Jones CP, Gregory LG, Causton B, Campbell GA, Lloyd CM. Activin A and TGF-beta promote T(H)9 cell-mediated pulmonary allergic pathology. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Apr;129(4):1000-10 e3.

346. Lu LF, Lind EF, Gondek DC, Bennett KA, Gleeson MW, Pino-Lagos K, et al. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature*. 2006 Aug 31;442(7106):997-1002.

347. Meiler F, Zumkehr J, Klunker S, Ruckert B, Akdis CA, Akdis M. In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J Exp Med*. 2008 Nov 24;205(12):2887-98.

348. Giesecke C, Frolich D, Reiter K, Mei HE, Wirries I, Kuhly R, et al. Tissue distribution and dependence of responsiveness of human antigen-specific memory B cells. *J Immunol*. 2014 Apr 01;192(7):3091-100.

349. Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, et al. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 01;108(9):3701-6.

350. Wisniewski J, Agrawal R, Woodfolk JA. Mechanisms of tolerance induction in allergic disease: integrating current and emerging concepts. *Clin Exp Allergy*. 2013 Feb;43(2):164-76.

351. Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszc M, Blaser K, et al. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal



VIII Bibliografía

allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol.* 2003 May;33(5):1205-14.

352. Thunberg S, Akdis M, Akdis CA, Gronneberg R, Malmstrom V, Trollmo C, et al. Immune regulation by CD4+CD25+ T cells and interleukin-10 in birch pollen-allergic patients and non-allergic controls. *Clin Exp Allergy.* 2007 Aug;37(8):1127-36.

353. Syed A, Garcia MA, Lyu SC, Bucayu R, Kohli A, Ishida S, et al. Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T-cell function and hypomethylation of forkhead box protein 3 (FOXP3). *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Feb;133(2):500-10.

354. Sakaguchi S, Vignali DA, Rudensky AY, Niec RE, Waldmann H. The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2013 Jun;13(6):461-7.

355. Janson PC, Winerdal ME, Marits P, Thorn M, Ohlsson R, Winqvist O. FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. *PLoS One.* 2008 Feb 20;3(2):e1612.

356. Ciprandi G, Fenoglio D, Cirillo I, Vizzaccaro A, Ferrera A, Tosca MA, et al. Induction of interleukin 10 by sublingual immunotherapy for house dust mites: a preliminary report. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005 Jul;95(1):38-44.

357. Radulovic S, Jacobson MR, Durham SR, Nouri-Aria KT. Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+ CD25+ cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Jun;121(6):1467-72, 72 e1.

358. Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, et al. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell



Mecanismos inmunológicos implicados en la ITSC-DP. Papel de las Treg y Tef.

activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*. 2004 Feb 21;363(9409):608-15.

359. Fanta C, Bohle B, Hirt W, Siemann U, Horak F, Kraft D, et al. Systemic immunological changes induced by administration of grass pollen allergens via the oral mucosa during sublingual immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999 Nov;120(3):218-24.

360. Verhagen J, Blaser K, Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: T-regulatory cells and more. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2006 May;26(2):207-31, vi.

361. Adeegbe DO, Nishikawa H. Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Front Immunol*. 2013;4:190.

362. Schmitt EG, Williams CB. Generation and function of induced regulatory T cells. *Front Immunol*. 2013;4:152.

363. Burastero SE, Mistrello G, Falagiani P, Paolucci C, Breda D, Roncarolo D, et al. Effect of sublingual immunotherapy with grass monomeric allergoid on allergen-specific T-cell proliferation and interleukin 10 production. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008 Apr;100(4):343-50.

364. Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*. 2008 May;124(1):13-22.

365. Chung F. Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: interleukin-10, interleukin-12, interferon-gamma. *Mediators Inflamm*. 2001 Apr;10(2):51-9.

VIII Bibliografía

366. Wan YY, Flavell RA. TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. *J Clin Immunol*. 2008 Nov;28(6):647-59.
367. Chen W, Konkel JE. TGF-beta and 'adaptive' Foxp3(+) regulatory T cells. *J Mol Cell Biol*. 2010 Feb;2(1):30-6.
368. Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Zhang H, et al. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant*. 2004 Oct;4(10):1614-27.
369. Yamanaka K, Yuta A, Kakeda M, Sasaki R, Kitagawa H, Gabazza EC, et al. Induction of IL-10-producing regulatory T cells with TCR diversity by epitope-specific immunotherapy in pollinosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Oct;124(4):842-5 e7.
370. O'Hehir RE, Gardner LM, de Leon MP, Hales BJ, Biondo M, Douglass JA, et al. House dust mite sublingual immunotherapy: the role for transforming growth factor-beta and functional regulatory T cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Nov 15;180(10):936-47.