



Hospital Universitario de La Princesa

**“Inmunoterapia sublingual:
Mecanismos inmunológicos”**

Tesis Doctoral

Tania María Ramos García

Licenciada en Medicina

2017

Universidad Autónoma de Madrid
Hospital Universitario de La Princesa
Servicio de Alergología

Tesis Doctoral:

**“Inmunoterapia sublingual:
Mecanismos inmunológicos”**

Autor:

Tania María Ramos García
Licenciada en Medicina

Directores:

Domingo Barber Hernández
Licenciado en Ciencias Químicas
Doctor en Ciencias Químicas

Carlos Blanco Guerra
Licenciado en Medicina
Doctor en Medicina

Madrid, 2017

A Javier, Diana y Javi

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Durante la elaboración de esta tesis, muchas personas han participado en este proyecto y, por tanto, quiero expresarles mi gratitud .

Agradezco a mis directores de tesis, los Drs. Domingo Barber y Carlos Blanco, la ayuda incondicional que han mostrado en la elaboración de este trabajo, sus ideas, su tiempo y su consejo. En especial a Carlos, sin cuya insistencia nunca habria finalizado esta tesis.

Quiero dar las gracias al laboratorio ALK-Abelló, por su gran apoyo científico. Mención muy especial a Pilar Rico, Alicia Marín y María Arina, por su inagotable colaboración. Gracias también a Santiago Martín, por su labor en el manejo de datos estadísticos.

Mi agradecimiento a todos los miembros del Servicio de Alergología, por su contribución al reclutamiento de los pacientes. En especial a Laura Fernández y a Duarte Teixeira, por su excelencia en la extracción de los sueros y la toma de muestras.

Mi reconocimiento a Rosa Varona y Abel Suarez-Fueyo, por el gran trabajo en el procesamiento de las muestras enviadas al Centro Nacional de Biotecnología.

Recordar especialmente a todos los pacientes que han aceptado participar en el proyecto, por su disposición y tolerancia con las molestias ocasionadas.

A mi padre, madre y hermano, sin los que nada de esto hubiera sido posible, por ayudarme a alcanzar mis metas.

Y, finalmente, a los que mas quiero, a mis bichos por alegrar mi mundo y, muy especialmente, a mi esposo Javi, por estar a mi lado siempre, tanto en los buenos como en los malos momentos.

ABREVIATURAS

aTreg	Linfocito T regulador activado
CD	Cúmulos de diferenciación
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica
CTLA-4	Antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos
ELISA	Ensayo inmuno-absorbente ligado a enzimas
GPS	Estación polínica de gramíneas
GPSI	Primera estación polínica de gramíneas
GPSII	Segunda estación polínica de gramíneas
Ig	Inmunoglobulina
IgE-FAB	Unión al antígeno facilitada por IgE
IL	Interleucina
IFN	Interferón
IT	Inmunoterapia
iTreg	Linfocito T regulador inducido
mTreg	Linfocito T regulador memoria
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
Phl p 1	Antígeno 1 de <i>Phleum</i>
Phl p 5	Antígeno 5 de <i>Phleum</i>
SCIT	Inmunoterapia subcutánea
slgE	Inmunoglobulina E alérgeno-específica
slgG	Inmunoglobulina G alérgeno-específica
slgG ₁	Inmunoglobulina G de subclase 1 alérgeno-específica
slgG ₄	Inmunoglobulina G de subclase 4 alérgeno-específica
SLIT	Inmunoterapia sublingual
SQ-T units	Unidades de tableta de calidad estandarizada
TGF	Factor de crecimiento tumoral
Th1	Linfocitos T colaboradores de tipo 1
Th2	Linfocitos T colaboradores de tipo 2
Treg	Linfocito T regulador

Índice

AGRADECIMIENTOS.....	7
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	13
SUMMARY.....	15
INTRODUCCIÓN.....	17
1 Las enfermedades alérgicas.....	19
1.1 El aumento en la prevalencia de las enfermedades alérgicas.....	19
1.2 La epigenética y las enfermedades alérgicas.....	21
1.3 La marcha atópica.....	22
2 La rinitis alérgica.....	23
2.1 Clasificación de la rinitis alérgica.....	23
2.2 Epidemiología de la rinitis alérgica.....	25
2.3 Calidad de vida en la rinitis alérgica.....	25
2.4 Costes de la rinitis alérgica.....	26
2.5 Etiopatogenia y fisiopatología de la rinitis alérgica.....	26
2.6 Inmunidad innata y rinitis alérgica.....	28
2.7 Inmunidad adaptativa y rinitis alérgica.....	28
2.8 Células implicadas en la rinitis alérgica.....	30
2.9 Mediadores de la inflamación alérgica nasal.....	32
2.10 Clínica de la rinitis alérgica.....	33
2.11 Diagnóstico de la rinitis alérgica.....	33
3 La alergia al polen de gramíneas.....	36
3.1 Los alérgenos de las gramíneas.....	37
3.2 Diagnóstico de la alergia a gramíneas.....	38
3.3 El manejo de la alergia al polen de gramíneas.....	38
4 La inmunoterapia específica con alérgenos.....	39
4.1 Vías de administración de la IT específica con alérgenos.....	40
4.2 La inmunoterapia sublingual con comprimidos liofilizados de gramíneas.....	40
5 Mecanismos de acción de la inmunoterapia subcutánea.....	41
5.1 Cambios en los anticuerpos: respuesta humoral.....	41
5.2 Efecto de la IgG sobre la IgE y la respuesta alérgica.....	43
5.3 Cambios en las células efectoras.....	43
5.4 Cambios en las subpoblaciones de linfocitos T.....	44
5.5 Generación de linfocitos T y B reguladores.....	45
5.6 Efectos de la inmunoterapia subcutánea en la mucosa nasal.....	46
6 Mecanismos inmunológicos de la inmunoterapia sublingual.....	46
6.1 Peculiaridades de la administración oral de alérgenos.....	47
6.2 Cambios en la inmunidad humoral en respuesta a la SLIT.....	48
6.3 Cambios en el balance Th1/Th2 inducidos por la SLIT.....	50
6.4 Generación de linfocitos T reguladores en relación con la SLIT.....	51
6.5 Cambios en las células efectoras asociados con la SLIT.....	52
6.6 Cinética de la respuesta inmunológica a la SLIT.....	53

Justificación del estudio	55
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
Hipótesis del estudio	59
Objetivos	61
MATERIAL Y MÉTODOS	63
1 Selección de pacientes	64
1.1 Criterios de inclusión.....	64
1.2 Criterios de exclusión	65
1.3 Retirada de sujetos	66
1.4 Tratamiento	66
1.5 Medicación de rescate	67
1.6 Medicación concomitante.....	67
1.7 Programación de visitas y valoraciones	68
1.7.1 Primera visita	68
1.7.2 Visitas sucesivas	69
2 Evaluación de la respuesta inmunológica	70
2.1 Sangre completa	70
2.2 Muestras de suero.....	71
2.3 Detalles metodológicos de las técnicas utilizadas	72
2.3.1 Separación de PBMC.....	72
2.3.2 Análisis de las subpoblaciones linfocitarias por inmunofenotipado y por citometría de flujo.....	72
2.3.3 Análisis de inmunoglobulinas séricas IgE, IgG4 e IgG1	74
2.3.4 Ensayo de la unión al alérgeno facilitada por IgE (FAB).....	75
2.4 Evaluación de la mejoría clínica de los pacientes tratados con SLIT en tabletas de gramíneas	76
2.5 Estudio estadístico y presentación de datos.....	76
RESULTADOS	79
1 Características de los pacientes	81
2 Cambios inmunológicos en respuesta a la SLIT de gramíneas	93
2.1 Respuesta inmune humoral alérgeno-específica	93
2.2 Perfil de citocinas de tipo Th2	103
2.3 Correlación entre los cambios en la inmunidad humoral y celular	109
2.4 Correlación entre los cambios serológicos y la respuesta clínica	116
2.5 Aumento en la proporción de células productoras de IFN- γ	120
2.6 Proporción de los linfocitos T CD4 ⁺ con fenotipo regulador	124
2.7 Relación entre respuesta Th2 y Treg.....	130
2.8 Resumen de la cinética de los cambios inmunológicos a los 2 años de tratamiento	133
2.9 Resumen de la cinética de los cambios inmunológicos a los 5 años	135
DISCUSIÓN	137
CONCLUSIONES	149
REFERENCIAS	153

RESUMEN

Introducción

La inmunoterapia sublingual en tabletas es eficaz para el tratamiento de la rinitis por alergia a polen de gramíneas. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado la cinética a largo plazo de los cambios inmunológicos que se producen en los pacientes tratados con SLIT de gramíneas.

Objetivos

Se diseñó un ensayo clínico prospectivo de 5 años de duración, consistente en 3 años de tratamiento con SLIT de gramíneas y 2 años de seguimiento posterior tras suspender la SLIT.

Se analizaron los cambios inmunológicos producidos a nivel celular y humoral en sangre periférica, para tratar de identificar los parámetros inmunológicos fundamentales que pudieran explicar la respuesta clínica observada.

Resultados

Se incluyeron 58 pacientes con rinitis y/o asma bronquial por alergia a polen de gramíneas, de los que 30 completaron los 5 años del estudio. La administración de SLIT de gramíneas indujo una respuesta bifásica, tanto a nivel de inmunidad humoral como celular, que persistió 2 años tras finalizar 3 años de tratamiento. La respuesta Th2 inicial consistió en un incremento en la IgE sérica específica frente a los alérgenos principales de Phleum, Phl p 1 y Phl p 5; así como en la proporción de células productoras de citocinas Th2, en concreto de IL-4. Esto se siguió de un descenso de la respuesta Th2, con una desviación de las citocinas hacia perfil Th1, lo que se tradujo en un aumento en la proporción de

células productoras de IFN-gamma. El descenso de la producción de IL4 a corto plazo se correlacionó con la instauración de una respuesta T reguladora de memoria, que se consolidó en el segundo año de tratamiento.

Otros hallazgos relevantes fueron el incremento progresivo tanto de los niveles de IgG4 específica como del bloqueo en la unión al alérgeno facilitada por IgE. Del mismo modo, se produjo un descenso en la cifra de eosinófilos en sangre periférica durante la estación polínica de gramíneas.

En el 70% de los pacientes, al finalizar el ensayo clínico se observó una ratio de IgE/IgG4 específicas inferior a la encontrada antes de la administración de la inmunoterapia. Además, en el 83% de los pacientes se detectó una disminución mantenida del bloqueo en la unión al alérgeno facilitada por IgE.

Es de destacar que se demostró una asociación estadísticamente significativa entre el descenso de los eosinófilos en sangre periférica durante la estación polínica y la reducción en los títulos de IgE específica con respecto a los niveles previos a la SLIT, mostrando estos últimos correlación con la respuesta clínica.

Conclusiones

Nuestros resultados sugieren que la persistencia en la mejoría clínica que se observa en los pacientes 2 años tras la finalización de un periodo de 3 años de tratamiento con SLIT de gramíneas, está asociado con la adquisición de una respuesta celular T reguladora, que se establece de forma estadísticamente significativa el segundo año de tratamiento y que a su vez se relaciona con un descenso de los niveles de eosinófilos en sangre periférica y de la IgE sérica específica.

SUMMARY

Introduction

Sublingual administration of *Phleum pratense* allergen immunotherapy (SLIT) tablets is a clinically efficient treatment for grass pollen–induced allergic rhinoconjunctivitis. However, kinetics of immunological changes in patients undergoing grass tablet SLIT treatment has not been adequately studied.

Objectives

A 5-yr prospective clinical trial was designed, including a 3-yr grass tablet SLIT treatment period followed by 2 additional years after SLIT discontinuation.

Systemic effects of SLIT on both humoral and cellular immune responses were evaluated in peripheral blood samples, in order to try to identify key immunological parameters that could explain sustained clinical benefit.

Results

Out of the 58 patients initially recruited, 30 completed the 5-yr protocol. Grass tablet SLIT administration induced a 2-phase systemic humoral and cellular response that mostly persisted 2-yrs after therapy discontinuation. The Th2 response was initially exacerbated, detected as an increase in both allergen-specific IgE (sIgE) levels and IL-4 producing cells; followed by downregulation of the Th2 response, with a shift toward a Th1 cytokine profile, measured as an increment in IFN-gamma producing cells. Short term decrease on IL4 producing cells correlated with the generation of a memory Treg response, that was statistically significant the second treatment year.

A progressive increase in specific IgG4 (sIgG4) levels and IgE-facilitated allergen binding (FAB) blockage, as well as reduced grass-pollen-season peripheral-blood eosinophil counts, were also relevant findings.

sIgE/sIgG4 ratios at the end of trial were lower than preimmunotherapy in 70% of patients, meanwhile IgE-FAB remained lower in 83% of them. At the same time, a progressive development of a regulatory T cell response was observed in two thirds of the patients.

Interestingly, there was a statistical association between this regulatory response, the maintenance of lower eosinophil counts during grass pollen seasons, and sIgE titers lower than before immunotherapy treatment, being the last ones significantly associated with clinical response.

Conclusions

Our results suggest that the maintained clinical improvement observed in patients 2-yrs after finishing a 3-yr treatment period with grass tablet SLIT is linked to acquisition of a regulatory T cell response, consolidated in the second treatment year, which in turn is associated with lower eosinophil counts and sIgE levels.

INTRODUCCIÓN

1 Las enfermedades alérgicas

Las enfermedades alérgicas son el resultado de la respuesta errónea del sistema inmunológico, que reacciona de forma inadecuada frente a sustancias externas, que son inocuas para los pacientes no alérgicos. Las reacciones alérgicas se clasifican según el mecanismo inmune subyacente, siguiendo los criterios clásicos de la clasificación de Gell y Coombs (1). Las reacción de tipo I, mediadas por anticuerpos de tipo inmunoglobulina E (IgE), son las causantes de alergias respiratorias (incluyendo rinitis y asma bronquial), alergias a alimentos, a medicamentos, reacciones anafilácticas, etc. Estos procesos son muy importantes por su elevada prevalencia y potencial gravedad, ocasionando un deterioro significativo en la calidad de vida de los pacientes afectos y un elevado coste económico para los sistemas de salud.

1.1 El aumento en la prevalencia de las enfermedades alérgicas

Para conocer la evolución de la alergia debemos comprender que el ser humano se ha desarrollado bajo presión adaptativa, que le ha obligado a desarrollar un sistema inmune complejo, que aún estamos muy lejos de comprender totalmente. Frente a la evolución de las amenazas bacterianas, víricas y parasitarias, el sistema inmune ha generado dos tipos de respuesta: una inmediata, mediante el sistema inmune innato, que comienza a actuar horas tras la exposición al agente; y otra más lenta, pero mucho más específica y potente, por medio del sistema inmune adaptativo. Esta evolución se ha producido a lo largo de miles de años, con un perfeccionamiento progresivo.

En los últimos 10.000 años, las nuevas formas de organización social relacionadas con la agricultura y la ganadería, conllevan escasas condiciones de higiene y gran facilidad para la aparición de epidemias infecciosas, lo que ha persistido hasta el siglo XVIII, obligando a la adaptación inmune a esas condiciones. Durante ese periodo, la tasa de mortalidad en las edades tempranas de la vida rondaba el 50%. La esperanza de vida se ha modificado en estos últimos siglos. En el siglo XIX, con la instauración del sistema de alcantarillado y fuentes de agua potable, dicha mortalidad descendió hasta el 20%. Ya el siglo XX, el uso de los antibióticos, los programas de vacunación, la eliminación de los parásitos, el escaso contacto con animales domésticos, la limpieza extrema y la calidad del agua, consiguen reducir la mortalidad infantil por debajo del 1% (2).

Ante este cambio social, la prevalencia de las enfermedades alérgicas está en aumento en todo el mundo, tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo. Debido a esto, la alergia se considera un problema de salud prioritario. Según las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), cientos de millones de sujetos en el mundo sufren de rinitis y se estima que unos 300 millones tienen asma bronquial (3).

El incremento de la prevalencia de la alergia podría ser debido, al menos en parte, al descenso en las enfermedades infecciosas. Como hemos señalado, el sistema inmune ha evolucionado frente a las infecciones, siendo esta interacción necesaria para el desarrollo sano del ser humano. La ausencia de dicho contacto con microorganismos, provoca que el sistema inmune quede en un estado inmaduro, lo que favorece el desarrollo de las respuestas inmunológicas anormales, como son las reacciones alérgicas o autoinmunes.

Esto constituye la base de la “teoría de la higiene”, una de las que trata de explicar el aumento en la prevalencia de las enfermedades alérgica (2).

Dicha teoría postula que, en condiciones normales después del nacimiento, el patrón inicial de respuesta de linfocitos T colaboradores tipo 2 (Th2) se desplaza hacia un patrón de tipo 1 (Th1), al madurar bajo el estímulo de infecciones repetidas. La menor exposición del niño a agentes infecciosos y, en consecuencia, la menor estimulación del sistema inmune por antígenos microbianos que favorecen una respuesta tipo Th1, produciría un desequilibrio a favor de una respuesta de tipo 2, asociada a los procesos alérgicos (4). También se ha sugerido que la prolongación de la esperanza de vida condicionará la aparición de nuevos casos de alergia respiratoria en personas de edad avanzada (5).

1.2 La epigenética y las enfermedades alérgicas

En los últimos años se ha desarrollado una nueva disciplina científica denominada epigenética, que estudia cambios químicos del genoma que provocan alteraciones en la expresión de los genes. Lo importante es que dichas modificaciones son heredables. A modo de ejemplo, hoy sabemos que gran parte de las diferencias entre nuestra especie y el Neandertal son epigenéticas. Una hipótesis interesante e inquietante es que el cambio producido en los patrones de exposición a microorganismos, está provocando modificaciones epigenéticas en el sistema inmune y, si no descubrimos estrategias de prevención eficaces, la mayor parte de la población padecerá enfermedades inmunológicas a lo largo de las próximas décadas. Hoy en día

desconocemos como revertir las modificaciones epigenéticas introducidas en una población (6).

En esta época, en la que diversos sectores sociales cuestionan los programas de vacunación, es importante señalar que dichos programas han sido responsables en gran medida del drástico descenso de la tasa de mortalidad infantil. En ningún caso volver a la situación anterior, asociada a una gran mortalidad, conllevaría una alternativa. En el caso de las enfermedades alérgicas como la rinitis y/o asma bronquial, disponemos de la inmunoterapia específica con alérgenos (IT), que es el único tratamiento etiológico que puede modular el sistema inmune para ayudarle a recuperar su equilibrio (7).

1.3 La marcha atópica

De forma adicional, hoy en día asumimos que el estado pro-alérgico (o “atópico”) de un individuo es consecuencia de una falta de maduración del sistema inmune, que ya es evidente desde el nacimiento. A este respecto, diversos estudios señalan que el individuo nace ya sensibilizado a antígenos alimentarios que llegan vía transplacentaria. En concreto, las alergias más frecuentes en los primeros meses de la vida están causadas por leche y huevo. Pues bien, los individuos atópicos van a experimentar una evolución de su enfermedad en función de los antígenos a los que se encuentran expuestos. Es lo que se conoce como “marcha atópica” (8).

Dentro de esta marcha alérgica, los primeros síntomas suelen ser cutáneos, con la aparición de dermatitis entre los 3 meses y los 4 años. Posteriormente aparece la alergia alimentaria, que se solapa con la dermatitis en las edades

tempranas de la vida, entre los 4 meses y los 3 años. Más tarde comienzan las enfermedades infecciosas recurrentes, entre los 8 meses y 4 años. A partir de los cuatro años, el paciente desarrolla rinitis y asma bronquial, causados por alérgenos respiratorios, principalmente ácaros del polvo, pólenes, epitelios de animales y hongos (9). El principal causante de alergia respiratoria en nuestra área geográfica es el polen de gramíneas, que son las plantas que comprenden las distintas variedades de césped y espiguillas.

2 La rinitis alérgica

La rinitis alérgica se define como una enfermedad inflamatoria de la mucosa nasal mediada por IgE y causada por la exposición a una gran variedad de alérgenos. La rinitis ha sido considerada como una enfermedad leve pero, en los últimos años, ha quedado patente que constituye una causa infravalorada de morbilidad, que puede conllevar costes muy importantes para quien la sufre. Por otra parte, cada vez es más evidente su relevancia como factor de riesgo para el desarrollo de asma bronquial, con la que comparte el mecanismo inmunopatogénico, habiéndose llegado a establecer el concepto de “una enfermedad única de la vía respiratoria”, que engloba a la rinitis y el asma bronquial.

2.1 Clasificación de la rinitis alérgica

Clásicamente, la rinitis alérgica se ha clasificado teniendo en cuenta el periodo de exposición al alérgeno en estacional, perenne y ocupacional (10,11). En la

rinitis alérgica estacional los síntomas aparecen durante una estación concreta, en la cual los alérgenos (como los pólenes y algunos hongos) están presentes en la atmósfera. Mientras, en la rinitis alérgica perenne los síntomas no aparecen en una estación concreta. Por su parte, los principales alérgenos responsables de la rinitis perenne son los ácaros, epitelios de animales, hongos y cucarachas.

En los últimos años, un grupo de trabajo internacional ha consensuado una guía para el diagnóstico y manejo de la rinitis (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma, ARIA*). En ella, se propone una nueva clasificación de la rinitis alérgica, basada en la duración y frecuencia de los síntomas, diferenciando entre rinitis intermitente y persistente (dependiendo del número de días por semana y del número de semanas consecutivas durante las cuales el paciente tiene síntomas); así como entre rinitis leve y moderada-grave (en función de la intensidad de las manifestaciones clínicas y de su repercusión sobre la calidad de vida) (Figura 1).

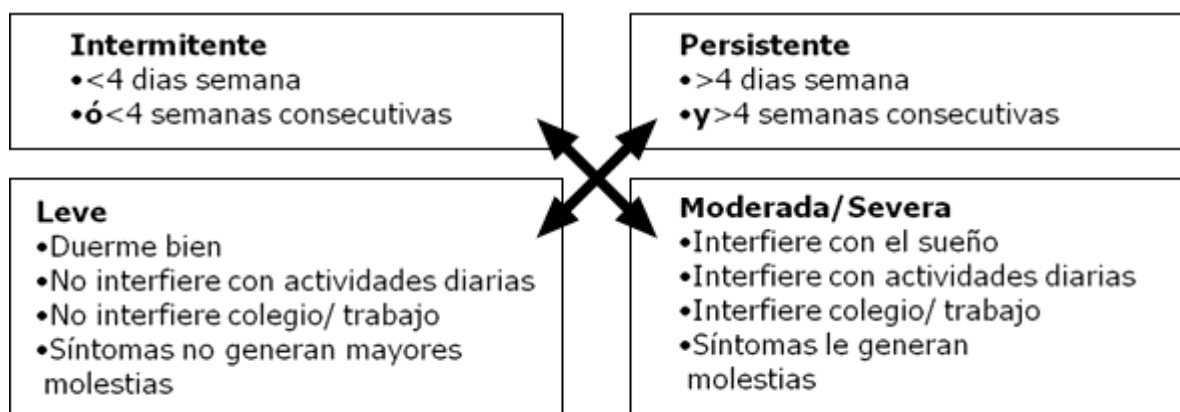


Figura 1. Clasificación de rinitis alérgica según la Guía ARIA

2.2 Epidemiología de la rinitis alérgica

La rinitis alérgica es un problema de salud mundial y representa una de las diez causas más frecuentes de consulta en Atención Primaria (12). Los estudios epidemiológicos indican que la prevalencia de la rinitis alérgica se ha ido incrementando de forma progresiva en los últimos 50 años (13), afectando en la actualidad hasta un 40% de la población mundial (14) y un 23-30% de la población Europea (15).

Durante el año 2013, el código de rinitis alérgica representó el 1.1% de las consultas registradas en el sistema de Atención Primaria de la Comunidad de Madrid, con una tasa de 36.5 consultas por cada 1000 (16). Datos interesantes se obtienen en Alergológica 2005, estudio epidemiológico realizado en España: el 55% de los pacientes atendidos por primera vez en Servicios de Alergología fueron diagnosticados de rinitis alérgica; de ellos, el 65% presentaban conjuntivitis y el 37% asma bronquial (17). De hecho, la rinitis es un factor de riesgo para el desarrollo de asma, tanto en adultos (18) como en niños (19).

2.3 Calidad de vida en la rinitis alérgica

A pesar de que la rinitis alérgica ha sido considerada tradicionalmente como un proceso patológico banal, tiene una morbilidad importante, con gran impacto en la calidad de vida. De este modo, un 59% de los pacientes con rinitis consideran sus síntomas como moderados o graves (20). En un estudio prospectivo internacional recientemente publicado, en el que se incluían un gran número de pacientes con rinitis alérgica, se observó que más del 80%

consideraba que la enfermedad tenía un efecto perjudicial en su vida diaria (21).

2.4 Costes de la rinitis alérgica

La rinitis es una patología crónica que tiene importantes repercusiones económicas sobre las personas afectadas y sus familias, los sistemas sanitarios y la sociedad en su conjunto (14). Los costes se dividen en directos (relativamente fáciles de calcular y que engloban todos los gastos médicos) e indirectos (muy difíciles de establecer, abarcan fundamentalmente la pérdida de días de trabajo o asistencia al colegio y la disminución del rendimiento, tanto escolar como laboral).

En España se ha llevado a cabo recientemente el Estudio FERIN sobre farmacoeconomía de la rinitis (22), que estima el coste medio total (costes directos + indirectos) de la rinitis alérgica en 1.708 euros por paciente al año. Además, el coste se correlaciona con la gravedad de la rinitis. Se calcula que la pérdida de productividad durante los periodos sintomáticos es cercana al 30%.

2.5 Etiopatogenia y fisiopatología de la rinitis alérgica

El epitelio nasal actúa como una barrera de defensa y juega un papel clave en los mecanismos de reconocimiento alérgico (23). Aunque la mayoría de las proteínas de los alérgenos que inhalamos son inmunógenas, sólo unas pocas son capaces de inducir una respuesta IgE. Para que una proteína sea alérgica es necesario que tenga epítomos para células B, a los cuales se

pueda unir la IgE; y epítopos para células T, capaces de inducir una respuesta de linfocitos Th2 (24). (Figura 2).

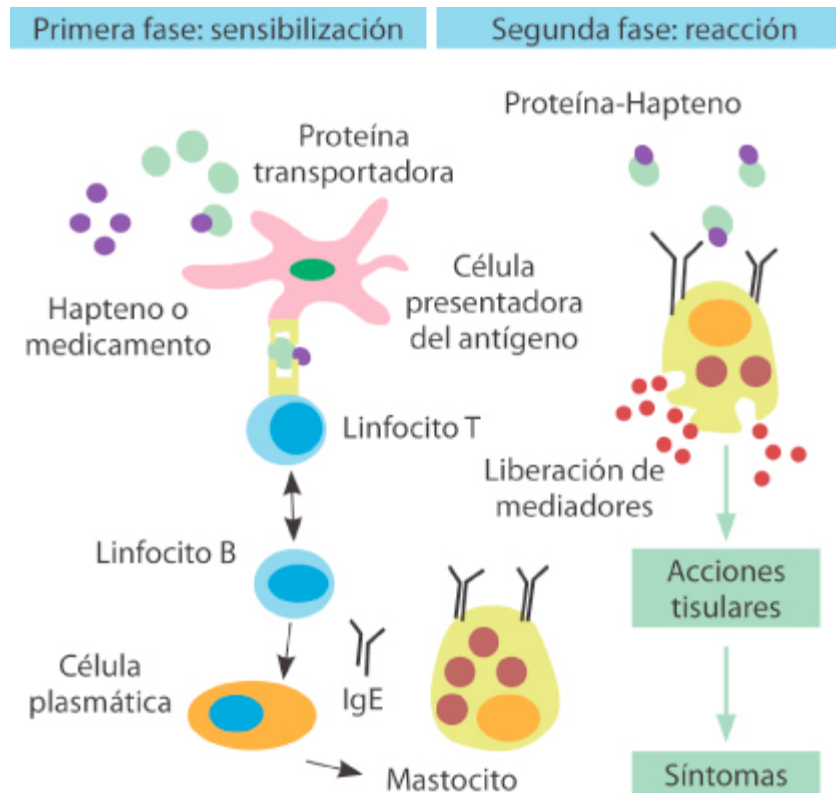


Figura 2. Fases de la hipersensibilidad mediada por IgE

La presencia de los epítopos apropiados es una condición necesaria pero no suficiente para convertir una proteína en alergénica. Es posible que sea muy importante la actividad bioquímica inherente asociada al antígeno (25). De esta forma, la inmunogenicidad depende de factores como el tamaño molecular, las propiedades bioquímicas del alérgeno, su estabilidad en los tejidos, así como la cantidad y duración de la exposición (26). También influyen la vía de exposición y los fenómenos inflamatorios que se producen en el tejido expuesto al alérgeno.

2.6 Inmunidad innata y rinitis alérgica

En la mucosa nasal comienza el reconocimiento innato de los alérgenos por componentes solubles presentes en la superficie mucosa. Esto tiene lugar en distintas fases: la de fijación y transporte de partículas; y la del reconocimiento innato por células inmunes y no inmunes de la vía aérea. Para tal fin, las células epiteliales expresan una gran variedad de receptores de reconocimiento de patógenos (PRR), que detectan los llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y asociados a lesión tisular (DAMP). La activación de dichos PRR, representa uno de los pasos clave en el proceso de sensibilización Th2, liberando grandes cantidades de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y otros factores que atraen a células Th2, células dendríticas, eosinófilos, basófilos y otras células inflamatorias (27).

2.7 Inmunidad adaptativa y rinitis alérgica

La respuesta alérgica en la mucosa nasal tiene 2 fases. La llamada “fase precoz”, ocurre en los primeros minutos de la exposición y persiste durante 2-3 horas. En esta fase se produce la degranulación de los mastocitos y basófilos, tras el entrecruzamiento de dos moléculas de IgE específica fijadas en la superficie de dichas células, lo que libera un conjunto de mediadores preformados, fundamentalmente histamina y triptasa. Como consecuencia de ello, se produce la estimulación de las fibras nerviosas, así como vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, hipersecreción de moco, estornudos y prurito (28, 29, 30, 31).

En esta fase también tiene lugar la síntesis *de novo* de otros mediadores, incluyendo leucotrienos (LTC₄, LTD₄, LTE₄), factor de activación plaquetaria (PAF) y prostaglandinas (fundamentalmente PGD₂), que actúan sobre los vasos sanguíneos y las glándulas mucosas, induciendo congestión nasal y secreción de moco (32, 33, 34). Otra citocina que se libera es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), muy importante en el reclutamiento de nuevas células inflamatorias.

En la llamada “fase tardía”, que comienza a las 4-6 horas de la exposición al alérgeno, la síntesis de los nuevos mediadores mencionados prolonga los síntomas de estornudos y prurito, pero sobre todo comporta una obstrucción nasal mantenida, que puede durar hasta 18-24 horas. Esta respuesta es predominantemente inflamatoria, que se debe a la atracción y activación de eosinófilos, linfocitos T, basófilos, neutrófilos y monocitos, a través de una cascada de citocinas y quimiocinas, liberadas inicialmente por las células efectoras primarias (mastocitos y basófilos) (35).

Las principales citocinas que intervienen en el desarrollo de la inflamación son la IL-5 (fundamental para el reclutamiento y prolongación de la supervivencia de los eosinófilos) (36); así como la IL-4 y la IL-13 (responsables del reclutamiento de basófilos, eosinófilos y linfocitos T hacia la mucosa nasal) (29, 30).

La exposición repetida puede acabar induciendo el remodelado de la mucosa nasal (que es la inducción de cambios persistentes en la vía aérea); y el efecto “cebado” (*priming*), es decir, el incremento de la respuesta al alérgeno a medida que se repite la exposición al mismo.

2.8 Células implicadas en la rinitis alérgica

Existen una gran variedad de células que participan en la rinitis, como son:

❖ Mastocitos

Los mastocitos son las principales células efectoras que mantienen la inflamación, inducen la síntesis de IgE y proporcionan la IL-4 necesaria para que los linfocitos Th0 se diferencien en Th2; a la vez que en los linfocitos B, productores de inmunoglobulinas, se induzca el cambio al isotipo IgE (37)

En los gránulos de los mastocitos se almacenan mediadores formados previamente, como histamina, triptasa y quimasa; así como citocinas del tipo de IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, TNF- α , etc. El principal responsable del reclutamiento y la retención de los mastocitos en el epitelio es el factor beta transformador del crecimiento (TGF- β), producido por las células epiteliales (37).

❖ Células epiteliales

Las células epiteliales tienen un papel inmunomodulador a través de la liberación de eicosanoides, endopeptidasas, citocinas y quimiocinas, incluyendo IL-6, IL-8, GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), SCF (que es un importante factor de crecimiento de los mastocitos, imprescindible para su maduración y supervivencia, y que también tiene actividad quimiotáctica), TGF- β (que es un factor quimiotáctico para los mastocitos), eotaxina y CCL5 (ligando de quimiocina 5). Estos 2 últimos son factores quimiotácticos para los eosinófilos (23). Asimismo, las células epiteliales nasales producen TSLP (linfopoyetina estromal tímica), IL-25 e IL-33 (27, 38) citocinas que favorecen la inflamación alérgica Th2 y el reclutamiento/migración de los eosinófilos hacia la mucosa nasal (39).

❖ Células endoteliales

Las células endoteliales participan activamente en la respuesta inflamatoria. Tras su activación, expresan moléculas de adhesión que permiten la atracción al foco de otras células, fundamentalmente eosinófilos (40).

❖ **Basófilos**

Los basófilos tienen receptores de alta afinidad para la IgE, a la vez que sus gránulos citoplasmáticos contienen histamina. En los sujetos con rinitis alérgica, infiltran la mucosa tras la exposición natural al alérgeno. Una vez activados, los basófilos liberan la histamina contenida en sus gránulos de manera inmediata, generando LTC₄. Además, liberan grandes cantidades de IL-4 e IL-13, que son cruciales para el desarrollo de respuestas Th₂, favoreciendo el cambio de isotipo de los linfocitos B, potenciando la síntesis de IgE (41).

❖ **Eosinófilos**

Diversos factores quimiotácticos atraen los eosinófilos a la mucosa nasal, como la IL-5, el CCL5 y la eotaxina (también llamada CCL11). Los gránulos de los eosinófilos contienen proteínas citotóxicas como proteína de unión a la manosa (MBP), peroxidasa del eosinófilo (EPO), proteína catiónica del eosinófilo (ECP) y neurotoxina derivada del eosinófilo (END) (42). Tras la activación, también se produce la síntesis de mediadores lipídicos como LTC₄, tromboxano A₂ y PAF (43), así como la liberación de diversas citocinas, incluyendo IL-4, IL-5 y GM-CSF (36). Los eosinófilos desempeñan un papel importante en la fase tardía de la respuesta alérgica y en la inflamación crónica (44,45).

❖ **Linfocitos**

Los linfocitos regulan y controlan la respuesta inmunológica. En los sujetos con rinitis alérgica persistente, se observa un aumento de los linfocitos CD4⁺, e

incluso de linfocitos B, que muestran signos de activación (CD25+), junto con un incremento de las citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) (46,47)

Los Treg son una subclase de células CD4+ CD25+ que suprimen la función de otros linfocitos a través de la producción de IL-10 y TGF- β . Su número aumenta tras la inmunoterapia, lo que sugiere que estas células están implicadas en los mecanismos de tolerancia, regulando a la baja la respuesta Th2 (48,49,50).

2.9 Mediadores de la inflamación alérgica nasal

Asociados a la respuesta celular encontramos a los mediadores de la inflamación, la mayoría de los cuales son sintetizados por diferentes células. Dentro de estos, podemos encontrar la histamina, la triptasa y los derivados del ácido araquidónico, como son la prostaglandina D2 y los leucotrienos. Sus acciones sobre los vasos sanguíneos, terminaciones nerviosas y glándulas de la mucosa nasal van a dar lugar a las manifestaciones clínicas: estornudos, prurito, rinorrea y obstrucción nasal.

El IFN γ proviene de los linfocitos Th1 y de otras células, tiene la función de activar macrófagos y células dendríticas, favorece la inmunidad celular e inhibe la respuesta tipo Th2. Por su parte, la IL-4 proviene de los linfocitos Th2, tiene un papel fundamental en la producción de IgE por parte de los linfocitos B, es necesaria para estimular la respuesta Th2 y disminuir la Th1 (51).

2.10 Clínica de la rinitis alérgica

Los síntomas típicos incluyen congestión nasal, rinorrea, prurito nasal, estornudos y, en los casos graves, pérdida del olfato. La congestión nasal es el síntoma predominante (hasta en el 90% de los pacientes con clínica estacional) (52) siendo descrito como el más molesto (53) con frecuencia, a los síntomas clásicos de la rinitis se asocian otros como, el lagrimeo y el prurito ocular, ótico y faríngeo.

Además, los pacientes pueden experimentar disnea, dolor de cabeza y alteraciones del sueño; así como un descenso del procesamiento cognitivo, de la velocidad psicomotora, del aprendizaje verbal y de la memoria (54).

2.11 Diagnóstico de la rinitis alérgica

El diagnóstico de rinitis se basa en la realización de una anamnesis detallada, la exploración física y las pruebas complementarias.

- **La anamnesis** deberá incluir antecedentes personales y familiares de atopia, características de los síntomas (tipo, duración, intensidad, horario), enfermedades asociadas (fundamentalmente conjuntivitis, dermatitis atópica y asma bronquial), factores desencadenantes (estacionalidad, exposición a animales, factores ocupacionales, irritantes inespecíficos, actividades de ocio, fármacos, etc.), respuesta al tratamiento administrado y aparición de posibles complicaciones.
- **La exploración física** incluye la inspección y palpación de la anatomía nasal y senos paranasales, seguidas de una rinoscopia anterior o de una endoscopia nasal. La auscultación pulmonar resulta fundamental en los

pacientes con rinitis persistente y moderada-grave, dada su asociación con asma bronquial.

- **Las exploraciones complementarias** abarcan:

- ❖ Las pruebas cutáneas

Son el instrumento fundamental para demostrar una reacción alérgica mediada por IgE y permiten confirmar el diagnóstico de una alergia específica.

La prueba intraepidérmica (prick) es el método de referencia, por su sencillez técnica y comodidad para el paciente, mostrando una alta correlación con los síntomas y las pruebas de provocación (55).

- ❖ La provocación nasal

Consiste en la exposición del paciente a dosis crecientes del alérgeno en la mucosa nasal. El alérgeno se puede administrar de distintas formas, como instilando un extracto en la mucosa del cornete, o con un mecanismo de pulverización nasal. Para valorar la respuesta al alérgeno existen diversos métodos, que pueden ser subjetivos, como escalas de puntuación de síntomas, u objetivos, como la rinomanometría anterior (activa o pasiva), la rinomanometría posterior activa, la rinometría acústica o la medición del flujo pico inspiratorio nasal (56).

- ❖ Técnicas *in vitro*

Las técnicas de laboratorio de mayor utilidad son las basadas en la determinación de la IgE sérica. Además, se dispone de técnicas que se fundamentan en las consecuencias de la interacción entre el alérgeno y la IgE específica fijada a la superficie de las células sanguíneas sensibilizadas, como son las pruebas de degranulación de los basófilos y de liberación de histamina. También es posible la determinación de mediadores de la inflamación, como

ECP o triptasa; o de la IgE específica en lavado nasal tras la provocación con alérgenos.

En general, la determinación de IgE sérica específica es el principal método complementario a las pruebas cutáneas, a las que no puede sustituir, y que debe relacionarse siempre con la clínica del paciente.

A continuación se resumen los métodos más importantes para determinar la IgE sérica.

- Determinación de IgE sérica total

Su cuantificación es llevada a cabo por diversos métodos de inmunoanálisis. En la actualidad se emplean métodos automatizados, como el UniCap® (Thermo Fisher Scientific Inc.).

- Determinación de IgE sérica específica

El primer método empleado para su cuantificación fue el RAST (*Radioallergosorbent test*) del laboratorio *Pharmacia*. Actualmente existen otros muchos aunque, en nuestro medio, el más utilizado es el *ImmunoCAP*® (*Thermo Fisher Scientific Inc.*), una modificación del RAST que le aventaja en sensibilidad (57). Una alternativa no disponible de manera comercial es el método ADVIA® (*Siemens Healthineers España*) que ofrece la ventaja de ser más específico, al no sufrir interferencias de otras inmunoglobulinas.

- Determinación de IgE sérica componentes alérgicos

En los últimos años se dispone de la posibilidad de determinar IgE frente a alérgenos naturales purificados o recombinantes, para el diagnóstico por componentes mediante *ImmunoCAP*, lo que aporta un perfil de sensibilización a ciertos alérgenos, bien sean específicos o indicadores de reactividad cruzada.

-Determinación de IgE sérica por micromatrices

También se puede realizar diagnóstico por componentes mediante sistemas de micromatrices, como el ISAC (*Thermo Fisher Scientific Inc* (58,59).

Gracias a esta técnica, con un solo ensayo se obtiene el perfil de sensibilización a más de 100 alérgenos naturales o recombinantes.

3 La alergia al polen de gramíneas

En España existen varios aeroalérgenos de interés. Las gramíneas, muestran una polinización de abril a junio, y constituyen la causa más importante de polinosis en Europa, debido a su gran alergenicidad y extensa distribución (60, 61, 62,63 , 64, 65, 66, 67, 68, 69).

La alergia al polen de gramíneas es, por tanto, una de las causas más frecuentes de alergia respiratoria y se asocia con más del 50% de los casos de rinitis alérgica en nuestro medio (70). Se estima que 45 millones de personas en Europa padecen de alergia al polen de gramíneas, muchos de los cuales creen que esta enfermedad afecta negativamente a su calidad de vida (70, 71). En Madrid se dan recuentos altos y relativamente cortos de gramíneas, pero de una gran intensidad, debido al clima continental, tan característico de esta área geográfica (65). También existe una relación con los niveles de pluviosidad en los meses de octubre a marzo, que incluso permiten pronosticar las concentraciones atmosféricas de gramíneas que existirán entre abril y junio (72).

Las gramíneas pertenecen a la subfamilia de las *Poaceas*. Dentro de esta subfamilia encontramos los géneros más importantes con respecto a la alergia

respiratoria a los pólenes o “polinosis” (en concreto, *Phleum*, *Dactylis*, *Lolium*, *Trisetum*, *Festuca*, *Poa*, *Anthoxanthum*, *Holcus*, *Agrostis* y *Alopecurus*). Existe una gran reactividad cruzada entre ellos, por lo que, en general, una o dos especies es suficiente para diagnosticar y tratar a los pacientes alérgicos. La gramínea más representativa desde el punto de vista alergénico es el *Phleum pratense* (Phl p) (73).

3.1 Los alérgenos de las gramíneas

Los alérgenos son las proteínas que inducen la respuesta IgE. Se clasifican en principales y minoritarios, en función de si el porcentaje de sensibilización que muestran los pacientes alérgicos es superior o inferior al 50%, respectivamente. Cuando los alérgenos muestran homología significativa en la secuencia de aminoácidos correspondiente al epítipo (región reconocida por la IgE) se puede ocasionar reactividad cruzada entre ellos.

Entre los alérgenos de las gramíneas encontramos una gran similitud física y química, lo que explica su elevada reactividad cruzada. Estos alérgenos se clasifican por grupos, cuyos componentes presentan secuencias moleculares comunes, independientemente de la especie de procedencia. Los alérgenos de gramíneas de los grupos I y V son los más inmunodominantes, tanto por su mayor capacidad de unión a la IgE, como por el porcentaje de pacientes que presentan IgE específica frente a ellos. En concreto, el 95 % de alérgicos a las gramíneas presentan IgE específica frente a alérgenos del grupo I, mientras que el 80 % la presentan frente a alérgenos del grupo V (74 ,75).

Los alérgenos principales del Phl p son Phl p 1 y Phl p 5. (76 , 77,78, 79 , 80). Todos los alérgenos principales de las gramíneas muestran un alto grado de similitud (81,82).

Alrededor del 10% de los pacientes alérgicos a las gramíneas pueden no estar sensibilizados a Phl p 1 y Phl p 5, sino a otros alérgenos de gramíneas, como Phl p 2, Phl p 4, o Phl p 11. En cuanto a la prevalencia de sensibilizaciones por alérgeno, a Phl p 1 es muy alta (cercana al 90%), mientras que a Phl p 5 se encuentra entre el 50 y el 80%, dependiendo de las áreas.

3.2 Diagnóstico de la alergia a gramíneas

La alergia respiratoria a gramíneas se diagnóstica en base a la historia clínica de rinitis y/o asma bronquial, complementándose con pruebas cutáneas y determinación de IgE específica, tal y como se ha comentado en el apartado general de rinitis. En caso de duda sobre la implicación de las gramíneas en la alergia respiratoria, cabe la posibilidad de realizar una prueba de provocación específica, consistente en exponer de manera controlada al paciente a un extracto de alérgenos debidamente cuantificados.

3.3 El manejo de la alergia al polen de gramíneas

El manejo de la alergia respiratoria a gramíneas incluye uno o más de los siguientes pasos:

- Evitación de las causas de la alergia
- Educación del paciente

- Medicación, sintomática y preventiva
- Inmunoterapia específica

La evitación es especialmente difícil en el caso de los pólenes. Si bien los tratamientos sintomáticos pueden ofrecer un alivio a corto plazo, no tratan la causa de la enfermedad alérgica. Por su parte, la medicación preventiva no puede proporcionar una remisión prolongada de los síntomas, una vez finalizado el tratamiento (por carecer de efecto a largo plazo). Además, pese al uso de tratamiento farmacológico, un gran número de pacientes sigue experimentando de por vida síntomas alérgicos. (83, 84).

4 La inmunoterapia específica con alérgenos

La inmunoterapia específica con alérgenos (IT) es una forma efectiva de reorientar la respuesta inmunológica inapropiada de los pacientes alérgicos. De hecho, hoy en día es la única opción de tratamiento causal, capaz de alterar el curso natural de la enfermedad alérgica, reduciendo la aparición de los síntomas y el consumo de medicación sintomática, mostrando efecto a largo plazo, tras finalizar el tratamiento. Por tanto, es capaz de actuar sobre los mecanismos inmunopatológicos de la reacción alérgica, evitando la aparición de nuevas sensibilizaciones y la evolución a asma (85, 86).

La IT para el tratamiento de la alergia respiratoria a gramíneas se lleva utilizando desde hace más de 100 años, desde que fue introducida por Noon y Freeman a principios del siglo XX (87,88). Para poder instaurar un tratamiento adecuado con inmunoterapia es necesario conocer el polen que causa la patología y realizar un diagnóstico en profundidad. Además, con respecto a las

gramíneas, existe evidencia científica de que una sola especie, pueden utilizarse con éxito para el tratamiento de los pacientes (89)

4.1 Vías de administración de la IT específica con alérgenos

Tradicionalmente, la inmunoterapia se ha administrado por vía subcutánea (90,91). Sin embargo, debido a su perfil de seguridad y a la necesidad de ser administrada bajo supervisión médica, la administración de la terapia subcutánea se ha restringido en algunos países al ámbito hospitalario. (83, 91).

El desarrollo de la inmunoterapia en forma de gotas sublinguales ha proporcionado una alternativa más segura y cómoda a la vía subcutánea, permitiendo su administración en el domicilio del paciente (83,92).

4.2 La inmunoterapia sublingual con comprimidos liofilizados de gramíneas

El uso de liofilizados orales constituye un paso más allá en el campo de la inmunoterapia con polen de gramíneas. Ha demostrado ser seguro y eficaz en rinoconjuntivitis, en ensayos debidamente controlados realizados con un número elevado de pacientes (93,94,95,96).

Este hecho ha permitido el registro como medicamento en 2007 en España de una IT con liofilizados orales de gramíneas denominada GRAZAX® (93).

El efecto de esta IT se mantiene durante 3 años de tratamiento y persiste a los 2 años de suspender el mismo. (95). Al ser la primera IT registrada como

medicamento, existiendo evidencia suficiente sobre su seguridad y eficacia, se decidió utilizar dicha IT para realizar la presente tesis doctoral.

5 Mecanismos de acción de la inmunoterapia subcutánea

Los estudios sobre la respuesta inmunológica local y sistémica a la IT convencional, administrada por vía subcutánea, han sugerido varios mecanismos para explicar su eficacia.

5.1 Cambios en los anticuerpos: respuesta humoral

La presencia de IgE específica en suero y sobre la superficie de mastocitos y basófilos es característica de la enfermedad alérgica y, de hecho, la exposición a alérgenos relevantes provoca una elevación de la IgE específica, tanto en suero como en el órgano de choque (97). Es bien conocido que durante la estación polínica los pacientes alérgicos al polen de las gramíneas experimentan una elevación transitoria de la IgE frente al polen de *Lolium perenne* y sus principales componentes moleculares (Lol p 1, 2, 3 y 5), que se sigue de un descenso gradual posterior (98).

Del mismo modo, una vez que se inicia la administración de la IT, se produce una elevación de la IgE en suero, que se sigue de una disminución a los 3-6 meses de tratamiento. El efecto de la dosis es importante, pues mientras que las dosis bajas de antígenos favorecen la respuesta IgE, son las dosis altas las

que se asocian con una disminución de la misma. El descenso en suero de la IgE aparece mucho más tarde que la respuesta clínica y tampoco se correlaciona con la magnitud de la mejoría tras el tratamiento (99,100,101,102,103, 104 , 105, 106, 107).

Por su parte, respecto a la IgG, los subtipos IgG1 e IgG4 se incrementan específicamente de 10 a 100 veces sobre sus valores basales, de una manera precoz tras las primeras dosis de IT, y continúan aumentando con las dosis sucesivas y acumuladas del alérgeno (107, 105,106).

El cambio de isotipo de producción de inmunoglobulinas IgE, depende de citocinas de tipo Th2 (IL-4 e IL-13), así como de la interacción de CD40 con su ligando, presentes en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC, entre ellas los linf-B) y de los linf-T, respectivamente (108). En presencia de IL-4, la IL-10 favorece el cambio a IgG4 (109,110,111,112).

De hecho, tras la inmunoterapia con polen de gramíneas, se observa un incremento de IL-10 que va paralelo a la supresión de la respuesta tardía y precede a la elevación de IgG4 y a la respuesta clínica. (111).

Así mismo, se ha visto que tras la inmunoterapia con polen de gramíneas, aparecen niveles elevados de IgA2 específica e IgA polimérica que, a su vez, estimulan la producción de IL-10. (113). A su vez, los linfocitos T reguladores (Treg y Tr1) se incrementan en el curso del tratamiento, produciendo IL-10, que ejerce un efecto inhibitorio sobre la síntesis de IgE y estimula la producción de IgG4 (110, 112, 114).

5.2 Efecto de la IgG sobre la IgE y la respuesta alérgica

El papel de la IgG en la tolerancia inducida por la inmunoterapia se conoce desde hace tiempo, al demostrarse que el suero de los sujetos que recibían IT contenían unos factores específicos que les protegían frente a la reacción inflamatoria alérgica (115). Estos factores, identificados como IgG, tienen una capacidad bloqueante al competir con la IgE por el alérgeno (116,117).

Se han descrito hasta tres mecanismos diferentes para explicar la influencia de la IgG en la inhibición de la activación mastocitaria por parte de la IgE:

- Inhibición de la presentación del antígeno facilitada por la IgE. La IgG específica interfiere en la unión de la IgE con el receptor de baja afinidad de la IgE (CD23), inhibiendo secundariamente la activación de los linfocitos T.
- Competición con la IgE en su unión al FcεRI o receptor de alta afinidad para la IgE.
- Internalización de la IgE sin activación mastocitaria. Cuando la IgG reconoce los mismos epítomos que la IgE, simplemente bloquea su acción, pero no es capaz de regular su expresión negativamente. Por el contrario, cuando reconoce epítomos diferentes, los complejos de IgG y el alérgeno provocan la internalización de FcεRI-IgE sin activación mastocitaria. Esta manera de actuar explicaría el funcionamiento de algunos alergoides y moléculas hipoalérgicas (118).

5.3 Cambios en las células efectoras

En las fases más tempranas de la administración de IT con veneno de himenópteros parece existir un “efecto de dosis”, de tal forma que la degranulación y liberación de mediadores se produciría, pero en cantidades

inferiores a las necesarias para desencadenar una reacción. En este sentido, se ha demostrado un descenso de la actividad liberadora de histamina de los basófilos durante la IT (119). Además, la IT actúa inhibiendo la migración celular al foco tras la exposición alérgica, tanto de forma directa como a través de una inhibición de los mediadores proinflamatorios (100,101,102,103, 99)

5.4 Cambios en las subpoblaciones de linfocitos T

Los linfocitos T CD4+ de los sujetos alérgicos reconocen los mismos epítomos que los linfocitos T CD4+ de los sujetos que no lo son. Por lo tanto, no parece que se trate de un problema de reconocimiento, sino de la calidad o tipo de respuesta generada, el clásicamente conocido como paradigma Th1-Th2. Así, la inducción de tolerancia que persiste tras terminar el tratamiento con IT, se habría atribuido a la inversión del cociente Th1-Th2, con un aumento en la respuesta Th1, en detrimento Th2 (114,120)

Sin embargo, no todos los estudios confirman esta hipótesis (121,122).

Cabe la posibilidad de que los cambios del perfil de linfocitos se puedan detectar únicamente en los órganos de choque. Utilizando el modelo de alergia al veneno de los himenópteros, se ha demostrado que tras la administración de la inmunoterapia se produce un aumento relevante de IFN- γ , que va paralelo al descenso de IL-4, junto a la muerte por apoptosis de linfocitos T CD4+. Los cambios en el patrón de citocinas y, en consecuencia, el predominio Th1, suceden muy precozmente tras la IT. De hecho, tan sólo 14 días después de iniciado el tratamiento con IT es evidente el predominio Th1 (123).

5.5 Generación de linfocitos T y B reguladores

Estudios más recientes sugieren que el factor esencial en la inducción y el mantenimiento de la tolerancia a los alérgenos es la regulación activa a través de los llamados linfocitos T y B reguladores, productores de IL-10 (124,125) Estos linfocitos controlan las respuestas inmunitarias frente a patógenos e impiden las respuestas a antígenos propios. Los linfocitos reguladores, que son CD4+CD25+, producen IL-10 y TGF- β tras IT y suprimen la respuesta proliferativa de los linfocitos Th2, en una forma dosis-dependiente(114, 122).

Por tanto, la tolerancia periférica se inicia con IL-10 y TGF- β secretados por los linfocitos T reguladores (Treg) específicos para el alérgeno en el curso de la IT. El conjunto de linfocitos reguladores usa múltiples factores supresores para controlar la actividad no deseada de los linfocitos de Th2, llevándolos a un estado de tolerancia. La tolerancia de los linfocitos de Th2 es periférica, se inicia tras la secreción de IL-10 y TGF- β , que suprimen la producción de IgE e inducen la producción de IgG4 e IgA. Como consecuencia de la inhibición Th2, las citocinas propias de este tipo de células (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) se encuentran también inhibidas. La IL-10 es una citocina que aumenta la producción de IgG4, al mismo tiempo que inhibe el cambio de clase a la IgE mediado por la IL-4 y favorece la producción de IgG1, que se detecta durante las fases iniciales de la IT. A todo esto se añade el aumento en la producción de IgA específica frente al alérgeno, lo que se relaciona con la presencia de TGF β .

5.6 Efectos de la inmunoterapia subcutánea en la mucosa nasal

Los cambios inmunológicos no sólo aparecen en sangre periférica, sino también en la mucosa nasal de sujetos con rinitis. En este sentido, se ha comprobado que tras recibir IT existe un aumento significativo en el número de células que expresan mRNA para IL-10 en la mucosa nasal de sujetos con rinitis (112).

6 Mecanismos inmunológicos de la inmunoterapia sublingual

La SLIT con determinadas fuentes alérgicas ha demostrado su seguridad y eficacia en ensayos clínicos debidamente controlados, realizados con un número elevado de pacientes. Esto ha permitido el registro como medicamento de algunos productos para SLIT, concretamente en forma de comprimidos. En esta línea, consensos recientes reconocen la utilidad de este tratamiento en la rinitis alérgica.(126, 127).

Además, la modificación de la enfermedad alérgica inducida por la SLIT, persiste durante al menos 2 años tras un ciclo de 3 años de tratamiento (96)

Los estudios centrados en los cambios inmunológicos relacionados con la SLIT, fundamentalmente serológicos, muestran a veces resultados contradictorios, lo que se puede deber al diferente diseño. En general, la SLIT induce cambios inmunológicos sistémicos en línea con la SCIT, aunque más

modestos, pero además muestra mecanismos inmunes locales importantes a nivel de la mucosa oral.

Aunque estos mecanismos se asocian al éxito de la inmunoterapia, se sabe poco sobre la secuencia de los eventos y las vías que conectan estos mediadores de respuesta. La definición de los periodos de tratamiento óptimos, así como la identificación precoz de los pacientes respondedores o de marcadores subrogados de respuesta, podría servir para personalizar el tratamiento con IT de las enfermedades alérgicas.

6.1 Peculiaridades de la administración oral de alérgenos

La mucosa oral es un sitio privilegiado de presentación de antígenos, ya que está expuesta continuamente a proteínas extrañas de alimentos y microorganismos, frente a las cuales suele responder induciendo tolerancia en lugar de sensibilización (128).

Se ha demostrado que las células de Langerhans orales (oLC) son unas células dendríticas (DC) que difieren profundamente de las células presentadoras de antígeno (CPA) de la piel. El hecho de que las oLC expresen de forma constitutiva gran cantidad de receptores de alta afinidad para la IgE, FcεRI, además de MHC de clase I y II, así como moléculas co-estimuladoras del tipo del CD40, CD80 y CD86, indica que estas células juegan un papel especial en el sistema inmune regional de la mucosa oral (129). Además, se encuentran próximas a linfocitos T, siendo escasos los eosinófilos y mastocitos (130).

Estudios con alérgenos marcados confirman que son retenidos durante varias horas en la mucosa oral, tras la administración sublingual, permitiendo la interacción con las oLC y los linfocitos T, lo que ofrece la oportunidad de inducir efectos inmunológicos, tanto locales como sistémicos (131). La captación de los alérgenos por las oLC depende de la dosis y el tiempo de exposición. Tras la captación se produce un aumento en la producción de linfocinas tolerogénicas (IL-10 y TGF- β , provenientes tanto de las propias oLC como de los linfocitos T), a la vez que se incrementa la capacidad migratoria de las oLC hacia los órganos linfáticos regionales, favoreciendo la formación de linfocitos Treg (132). La activación del receptor tipo Toll (TLR) 4 por antígenos bacterianos aumenta la producción de IL-10 (133). El Fc ϵ RIIB de los linfocitos B también pudiera jugar un papel importante (134).

Los alérgenos para la SLIT se utilizan a dosis acumuladas muy superiores a las que se emplean para la SCIT, gracias a la buena tolerancia que muestra la mucosa oral. Otra diferencia es que los alérgenos para la SLIT no requieren del empleo de los coadyuvantes habituales utilizados en la SCIT, preservando los epítopos T y B, lo que también podría favorecer la tolerancia.

6.2 Cambios en la inmunidad humoral en respuesta a la SLIT

Tras un aumento inicial en la sIgE, la SLIT induce una disminución progresiva y suprime los incrementos estacionales relacionados con la exposición natural al alérgeno. A su vez, se constata un aumento progresivo en los pacientes tratados con SLIT de la sIgG1 e sIgG4 (favorecida por la IL-10). La sIgG4

guarda relación con la mejoría clínica, al actuar como anticuerpo bloqueante que compite con la IgE por la unión al antígeno, así como en la inhibición de la facilidad de presentación del alérgeno, de forma similar a lo ya descrito en el apartado de la SCIT (99,100,101,102,103)(104,105,106,107,96) .

En esta línea, se ha demostrado un aumento en los niveles de sIgG4 y una disminución en los de sIgE en el grupo tratado con SLIT de gramíneas y ácaros durante 2 años frente a placebo (130) El incremento en la sIgG4 se asocia con la eficacia clínica, ocurre ya en la primera estación polínica tras el inicio del tratamiento y es independiente de que la pauta de SLIT utilizada sea perenne, pre- o co-estacional (131).

Los cambios en los niveles de inmunoglobulinas son tiempo y dosis dependientes (132), progresivos durante al menos 2 años (133,134), de menor magnitud que los inducidos por la SCIT (108,134).

El hecho de que la respuesta humoral a los 4 meses con SLIT de gramíneas no es homogénea en todos los pacientes respondedores, sugiere que pueda haber otros mecanismos inmunes implicados (135).

Se ha demostrado que la SLIT es capaz de inducir sIgA tanto sérica como en secreciones mucosas. En el caso particular de gramíneas, el aumento en la sIgA va paralelo al de sIgG4, a la expresión de TGF- β y a la mejoría clínica (110). Además, la sIgA1 y la sIgA2 se incrementan durante la estación polínica en respuesta a la SLIT al tiempo que aumenta la sIgG4 y su actividad bloqueante en el suero (136).

6.3 Cambios en el balance Th1/Th2 inducidos por la SLIT

Los linfocitos T CD4+ residentes son abundantes en los tejidos orales, en proximidad a las CPA. Dichos linfocitos incluyen tanto T supresores como efectores, de los tipos Th1, Th2 y Th17, implicados en la respuesta frente a patógenos. En la ausencia de señales de peligro, la respuesta por defecto frente a un antígeno sería la inducción de linfocitos Treg y Th1, productores de IL-10 e IFN- γ , respectivamente, así como inhibición de los Th2 (137).

Los resultados de los distintos estudios sobre la respuesta inmune celular al tratamiento con SLIT muestran resultados contradictorios (138). Por ejemplo, la mejoría clínica precoz a la SLIT de gramíneas no se asocia con los mínimos cambios en la proporción de linfocitos T que aparecen en las PBMC de los pacientes tratados, frente a los sujetos controles (139.). Utilizando SLIT de abedul (117) se ha observado una clara respuesta linfoproliferativa con aumento del IFN- γ y descenso de citosinas de tipo Th2 (117,140, 141,142)

En el caso del polen de ambrosía se ha comprobado una reducción en la expresión de moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 y en la producción de IL-4, sugiriendo una menor respuesta de tipo Th2 (131).

La regulación a la baja de la respuesta de tipo Th2 y/o el cambio inmunológico a respuesta de tipo Th1, sugieren la inducción de un mecanismo de tolerancia (143, 144,145) la supresión de la inflamación alérgica y la generación de linfocitos T reguladores (Treg) (117,144, 146, 147 , 135)

6.4 Generación de linfocitos T reguladores en relación con la SLIT

En el sistema inmunológico humano, se sabe que las CPA presentes en la mucosa bucal tienden a ser tolerogénicas, en cuanto a que producen IL-10 e IL-12 en respuesta a la exposición a antígenos, induciendo la diferenciación de los linfocitos T vírgenes CD4⁺ hacia fenotipo Th1 y Treg (148). Los linfocitos Treg tienen múltiples efectos que controlan la respuesta inmunológica específica de alérgeno y la inflamación alérgica mediada por IgE (149). Estos linfocitos pueden inducir células dendríticas que favorecen la generación de más linfocitos Treg e inhiben la diferenciación de linfocitos T efectores (150); también inhiben a los linfocitos de tipo Th1 y Th2 e inducen la producción de IgG₄ y/o IgA por parte de los linfocitos B (149). Las citocinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) son precisas para la producción de IgE y la diferenciación, supervivencia y actividad de los mastocitos, basófilos, eosinófilos y de las células productoras de moco (151,152); una reducción en estas citocinas, junto con la producción de IL-10 y TGF β por los linfocitos Treg, suprime la inflamación alérgica inducida por las células efectoras (149)

En este contexto, la SLIT induce la producción de Treg del subtipo Tr1, que producen altos niveles de IL-10 y de TGF- β , que estimulan la producción de sIgG₄ e sIgA, respectivamente, e inhiben la de sIgE, induciendo tolerancia. Ambas citocinas, la IL-10 y el TGF- β , reducen la liberación de mediadores pro-inflamatorios e inhiben la producción de las citocinas Th2 (148). Varios estudios muestran un aumento en la producción de IL-10 en pacientes tratados con SLIT (117,141,153,154)

Este aumento se revierte con la depleción de las células CD25+, lo que implica que la IL-10 proviene de los Treg (117). Por su parte, el TGF- β puede mediar la supresión inmune precoz en la SLIT con ácaros (154).

A este respecto, el Foxp3 es un factor de transcripción clave en el desarrollo y función de los Treg. Se ha demostrado un aumento en el número de células Foxp3+ en biopsias de epitelio oral de pacientes tratados con SLIT de gramíneas frente a placebo (136).

Más aún, la tolerancia a largo plazo puede ser inducida por modificaciones epigenéticas en el Foxp3, por medio de una reducción en la metilación de los sitios CpG (regiones del DNA con una citosina y una guanina separadas por un fosfato, que al ser metiladas pueden silenciar el gen correspondiente), dentro del locus Foxp3 de los linfocitos Treg (130).

Por otro lado, la SLIT con polen de ambrosía, con independencia de la pauta utilizada, resulta en un aumento en la producción de IL-10, presumiblemente de los Treg, así como en la expresión del ligando 1 de muerte celular programada (proteína trans-membrana, homóloga al B7, con papel inmunosupresor) (131).

6.5 Cambios en las células efectoras asociados con la SLIT

Al igual que ocurre con la SCIT, se ha observado un menor reclutamiento y activación de células proinflamatorias en la mucosa diana tras el tratamiento con SLIT. De forma específica, se ha demostrado una reducción en los mastocitos (tanto positivos para triptasa/quimasa, como positivos sólo para triptasa), basófilos y eosinófilos en la piel, nariz, ojos y mucosa bronquial de los

pacientes tratados (128). Por último, en lo que a células efectoras se refiere, se ha observado que tras la SLIT se produce una reducción de la respuesta de los mastocitos y los basófilos, relacionada con una regulación rápida del receptor 2 de la histamina, que es un importante supresor de su activación (155). Los resultados comunicados respecto a los cambios inducidos por la SLIT sobre la activación de basófilos son contradictorios y, mientras la SLIT con polen de gramíneas no pareció inducir cambios significativos en la activación de estas células en sangre periférica tras 4 meses de tratamiento (156), en otro estudio se ha demostrado una reducción significativa en la activación de los basófilos tras SLIT con polen de gramíneas y ácaros cuando se comparan con el placebo (135).

6.6 Cinética de la respuesta inmunológica a la SLIT

Queda claro que la SLIT induce cambios tanto en la inmunidad humoral como celular, afectando esta última al balance Th1/Th2 y a la generación de Treg, repercutiendo a su vez en las células efectoras. El estudio de la cinética de la respuesta inmune a la SLIT permite inferir la relación temporal entre los distintos cambios observados. Lo más difícil es averiguar cuáles son los cambios primarios, claves en esta respuesta inmune, y cuáles son secundarios. La expresión de determinados marcadores de las DC, en concreto C1Q (componente 1q del sistema del complemento) y STAB1 (estabilina-1), se incrementa en las PBMC de los pacientes que responden a la SLIT, cuando se les compara con los que no lo hacen o con sujetos controles. Se ha pensado en la posibilidad de emplearlos como biomarcadores de respuesta precoz y

predictores de la tolerancia clínica (157). El nivel de inducción de Treg, definido como la proporción de IL-10+ Foxp3+ entre los linfocitos CD4+ CD25+, se ha postulado como biomarcador terapéutico potencial para la SLIT (158).

Son precisos estudios adicionales para comprobar si estos u otros marcadores de respuesta precoz inmunológica pueden ser utilizados en la práctica clínica para predecir la mejoría clínica de los pacientes.

Justificación del estudio

En el momento de diseñar el presente estudio, poco tiempo antes se había registrado como medicamento la SLIT en tabletas de gramineas utilizada como intervención en nuestra muestra de pacientes. Para ello, se completaron los pertinentes ensayos clínicos debidamente randomizados, en ciego contra placebo, en un número elevado de pacientes, que permitieron demostrar la seguridad y eficacia del producto, requisito indispensable para conseguir su autorización.

Sin embargo, se desconocen los cambios inmunológicos, en general y a largo plazo en particular, inducidos por la SLIT en tabletas de gramineas. De hecho, no se sabe si esta inmunoterapia induce sólo modificaciones en la respuesta inmune local o, por el contrario, también da lugar a alteraciones inmunológicas detectables en linfocitos de sangre periférica. Es posible que utilizando las pruebas adecuadas, se puedan detectar cambios inmunológicos en sangre periférica que sean resultado de dicho tratamiento, lo que simplificaría mucho la recogida de muestras y obtención de datos.

Los estudios clínicos demuestran que la SLIT en tabletas de gramineas ocasiona una mejoría clínica detectable a partir de cuatro meses de tratamiento, que se mantiene a los tres años de continuar con la medicación. Es razonable pensar que los cambios inmunológicos precoces, que tengan lugar en los primeros días o semanas de tratamiento, se relacionen de forma significativa con las modificaciones en la respuesta inmune a largo plazo. De tal forma que, obteniendo datos en varias visitas efectuadas en las primeras

semanas de tratamiento, se puedan identificar biomarcadores de respuesta inmune que predigan la adecuada respuesta a la inmunoterapia a largo plazo. Además, los estudios también comprueban que la mejoría clínica en respuesta a la SLIT con tabletas de gramíneas, sigue siendo significativa 2 años tras un ciclo de tratamiento de 3 años de duración. Por lo tanto, esperamos poder demostrar que los principales cambios inmunológicos potencialmente detectables durante los 3 años de tratamiento, puedan seguir presentes en los 2 años siguientes a la finalización de la SLIT.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis del estudio

Postulamos que el tratamiento con SLIT en comprimidos liofilizados de gramíneas puede dar lugar a cambios inmunológicos, relacionados con la inducción de la tolerancia asociada a su efectividad clínica, potencialmente detectables en sangre periférica.

Estos cambios inmunológicos podrían afectar tanto:

- A la inmunidad humoral, en concreto a la cifra de IgE e IgG específica a los alérgenos principales de gramíneas (grupos 1 y 5), así como a la unión al alérgeno facilitada por IgE.
- A la inmunidad celular, en lo relativo al balance en la respuesta de linfocitos Th1/Th2.
- A la generación de una subpoblación de linfocitos T reguladores.

En cuanto a la cronología de la respuesta inmune a la SLIT en comprimidos liofilizados de gramíneas, postulamos que pueden existir cambios inmunológicos precoces, que tengan lugar en las primeras semanas o meses de tratamiento, capaces de predecir la respuesta inmunológica tardía, que tendría lugar a partir del primer año de tratamiento. De identificarse, dichos cambios inmunológicos precoces serían potenciales biomarcadores de adecuada respuesta a la inmunoterapia específica con alérgenos.

Por último, tras un ciclo de 3 años de tratamiento, los principales cambios inmunológicos que se detecten deberían persistir a los 2 años de suspender el tratamiento, en concordancia con la duración demostrada del efecto clínico, resultado de la modificación de la enfermedad alérgica subyacente.

Objetivos

1. Determinar los cambios serológicos (en los niveles séricos de IgE, IgG4 e IgG1, específicas frente a alérgenos 1 y 5 de gramíneas, así como en la unión al alérgeno facilitada por IgE), en respuesta al tratamiento con SLIT en comprimidos de gramíneas, tanto precoces (primeras semanas o meses) como tardíos (a lo largo de 3 años de tratamiento)
2. Determinar los cambios inmunológicos celulares, respecto al balance Th1/Th2 (medido como la proporción de células productoras de determinadas citocinas características de cada una de ellas), en respuesta al tratamiento con SLIT en comprimidos de gramíneas, tanto precoces (primeras semanas o meses) como tardíos (a lo largo de 3 años de tratamiento).
3. Cuantificar la respuesta Treg al tratamiento con SLIT en comprimidos de gramíneas, tanto precoces (primeras semanas o meses) como tardíos (a lo largo de 3 años de tratamiento).
4. Estudiar si la exposición fisiológica a polen de gramíneas durante la estación polínica afecta a los cambios inmunológicos detectados.
5. Comprobar si los cambios inmunológicos detectados a lo largo de los 3 años de tratamiento, tanto serológicos como celulares y de generación de respuesta Treg, persisten a lo largo de los 2 años siguientes a finalizar el tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

1 Selección de pacientes

Se diseñó un ensayo clínico (EudraCT-2009-011453-41) de fase IV, abierto, exploratorio, unicéntrico, prospectivo longitudinal, en el que se reclutaron durante el verano y otoño de 2009 en el Hospital Universitario de La Princesa (HUP), 58 pacientes adultos diagnosticados de rinoconjuntivitis con o sin asma bronquial y sensibilización a polen de gramíneas. El objetivo principal era determinar marcadores biológicos relacionados con la tolerancia y la respuesta clínica al tratamiento con GRAZAX® 75000 SQ-T (GRAZAX). El protocolo fue valorado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del HUP. Previamente a la inclusión en el estudio, los pacientes recibieron información escrita mediante la hoja de información al paciente (Anexo 1), pudiendo solicitar las aclaraciones que consideraran necesarias. Si accedían a participar en el mismo, firmaban el consentimiento informado. La información relevante de estos pacientes, así como los resultados del estudio, se recogió en un cuaderno de recogida de datos (CRD).

1.1 Criterios de inclusión

Todos los pacientes cumplían todos los siguientes criterios de inclusión:

- Consentimiento Informado por escrito antes de entrar en el estudio.
- Varón o mujer entre 18 y 65 años de edad.
- Historia clínica de alergia (rinoconjuntivitis y/o asma) por sensibilización a polen de gramíneas de al menos 1 año de evolución.

- IgE sérica positiva a polen de gramíneas (ImmunoCAP \geq 0.7 kU/L) documentada en los 5 años previos.
- Prueba cutánea en prick (SPT) positiva a *Phleum pratense* (ALK-Abelló) con un diámetro de pápula \geq 3 mm.
- Prueba de embarazo negativa en mujeres potencialmente fértiles.
- Deseo de cumplir con el protocolo.

1.2 Criterios de exclusión

A su vez, los pacientes no debían cumplir ninguno de los siguientes criterios de exclusión:

- Haber sido tratados con inmunoterapia (IT) previa con polen de gramíneas.
- Historia clínica de asma y/o rinitis alérgica perenne.
- Pacientes con contraindicaciones para tratamiento con IT, de acuerdo a lo establecido por el subcomité de IT de la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica (EAACI) o la ficha técnica de GRAZAX.
- Prueba de embarazo positiva (en mujeres fértiles).
- Ser familiar cercano de los investigadores o del personal involucrado en el ensayo.
- Cualquier trastorno mental que imposibilite al sujeto la comprensión de la naturaleza, envergadura y las posibles consecuencias del ensayo y/o actitud no colaboradora.

- Dificultades para completar el ensayo por cualquier razón, incluyendo posible desplazamiento o períodos prolongados de viaje durante el tiempo que dure el ensayo.
- Uso de fármacos en investigación durante los 30 días anteriores o 5 vidas medias del fármaco, lo que se considere mayor tiempo, previo a la visita de selección.

1.3 Retirada de sujetos

Los sujetos eran informados de su derecho de abandonar el estudio en cualquier momento sin perjuicio alguno. En el caso de que un sujeto abandonase el estudio o fuese retirado del mismo, se completaba la página correspondiente del CRD, con los datos relativos a la fecha de salida, la razón de la misma y la persona que tomaba la decisión de la retirada / abandono.

Los sujetos que abandonaban el estudio después de iniciado el tratamiento no eran reemplazados.

1.4 Tratamiento

Todos los pacientes recibieron tratamiento diario con extracto de polen de gramíneas *Phleum pratense* GRAZAX, liofilizado oral de rápida disolución, proporcionado por ALK-Abelló (Dinamarca). Al tratarse de un estudio abierto, no controlado con placebo, los pacientes no eran aleatorizados. Todos los pacientes que cumplieron con los criterios de selección, fueron asignados al tratamiento activo y se les proporcionó un número de sujeto.

La dosis del estudio es un liofilizado oral diario, que debe tomarse preferiblemente por la mañana. Se debe colocar debajo de la lengua y evitar tragar durante aproximadamente 1 minuto. No se deben tomar alimentos o bebidas durante los 5 minutos siguientes.

Los sujetos eran instruidos para devolver toda la medicación sobrante o no utilizada en las visitas al centro establecidas. El cumplimiento del tratamiento se evaluó contando los comprimidos devueltos.

1.5 Medicación de rescate

A pesar del tratamiento con el medicamento en investigación, los sujetos del estudio podían requerir tratamiento adicional. Los pacientes empleaban la medicación de control y rescate indicada por el investigador para sus síntomas de rinoconjuntivitis o asma, de acuerdo con las guías de consenso. Los síntomas referidos por el paciente se anotaban como acontecimientos adversos (AA), si bien los síntomas de rinoconjuntivitis no eran anotados como AA, a no ser que existiera un cambio (en frecuencia o gravedad) respecto a la situación basal.

1.6 Medicación concomitante

Todos los tratamientos recibidos por parte del sujeto al entrar en el estudio o en cualquier momento durante el mismo eran considerados tratamientos concomitantes y anotados en la historia clínica y en el CRD. La medicación concomitante que pudiera interferir con el resultado de las pruebas efectuadas en las visitas era suspendida con la antelación suficiente.

1.7 Programación de visitas y valoraciones

En cada visita se realizaron diferentes procedimientos.

1.7.1 Primera visita

En la primera visita se efectuó lo siguiente:

- Obtención del consentimiento informado del sujeto antes de cualquier procedimiento del estudio.
- Datos demográficos (sexo, fecha de nacimiento, origen étnico) y medidas corporales (altura y peso).
- Historia médica, incluyendo historia de fumador.
- Evaluación de los criterios de inclusión y exclusión.
- Examen físico, que se basó en los siguientes sistemas corporales: cabeza (oído, nariz, garganta y ojos), sistema cardio-respiratorio (auscultación), piel, inspección de la cavidad oral y cualquier otro aspecto que pudiera resultar anormal.
- Constantes vitales, que incluían la tensión arterial y la frecuencia cardíaca.
- La espirometría (FEV1) se realizó en las visitas de selección (visita 1), visita final del estudio (visita 10) y en cualquier visita que el investigador considerara oportuno. En el caso de los pacientes asmáticos, se realizó también en el resto de las visitas y en cualquier visita no programada, siguiendo criterio del investigador.
- Se realizó prueba cutánea en prick (SPT) de diagnóstico en la visita de selección (visita 1), de acuerdo al siguiente panel: *Artemisia vulgaris*,

Betula verrucosa, *Cupressus sempervivens* (o arizonica), *Salsola kali*, *Parietaria judaica*, *Plantago lanceolata*, *Phleum pratense*, *Chenopodium album*, manzana (*Malus domestica*), melocotón (*Prunus persica*), *Olea europaea*, *Alternaria alternata*, *Dermatophagoides* mezcla, epitelio de perro, epitelio de gato, así como los correspondientes controles de histamina y solución salina.

- Prueba de embarazo en orina (en caso de mujeres en edad fértil).
- Extracción de sangre para determinaciones inmunológicas: sangre completa y suero.
- Muestra de mucosa oral recogida con isopo.
- Registro de medicación concomitante.
- Dispensación del medicamento en estudio. La primera dosis del medicamento se administró en el hospital y se mantuvo a los pacientes durante 30 minutos en periodo de observación.
- Entrega de cartilla para anotar AA.

1.7.2 Visitas sucesivas

En las siguientes visitas hasta la 15, se realizaron los procedimientos especificados en la mencionada. Tras la última visita se realizó contacto telefónico por parte del investigador una semana después de la última dosis administrada del GRAZAX, para asegurarse de que no hubiera ningún AA.

Para la evaluación de la respuesta inmunológica al tratamiento, se obtenían muestras de mucosa oral, sangre completa y suero. Los análisis inmunológicos se realizaron tanto fuera de la estación polínica como en plena polinización de las gramíneas (mayo-junio). De este modo, para la determinación de los distintos parámetros, se recogieron muestras en los días 3 y 8, así como en los

meses 1, 4, 9 (coincidiendo este último con la primera estación polínica de gramineas, GPSI), 12, 21 (en la segunda estación polínica de gramíneas, GPSII) y 24, tras el inicio del tratamiento con SLIT.

El inicio de la estación polínica se consideró en función de los recuentos de polenes según lo publicado por el Comité de Aerobiología de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC). De este modo, si se alcanzaban recuentos de al menos 50 granos de polen de gramíneas por m³ durante al menos 3 días, se daba por iniciada la estación polínica.

2 Evaluación de la respuesta inmunológica

Para la realización de la evaluación de la respuesta inmunológica se obtenían muestras de mucosa oral, sangre completa y suero, en los tiempos establecidos en el esquema del estudio ya mencionado. La situación basal inmunológica de los pacientes se estableció en septiembre-octubre de 2009, antes de comenzar el tratamiento con GRAZAX.

2.1 Sangre completa

Se extrajeron en cada ocasión 15 ml de sangre periférica en tubos de vacío con Heparina Sódica (tapón verde). Las determinaciones se realizaron en el laboratorio del Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Los objetivos de este análisis eran:

- Determinar la distribución de poblaciones celulares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, células dendríticas (DCs) y subpoblaciones de linfocitos) haciendo uso de marcadores antigénicos

- de la superficie celular. Establecer el perfil de citocinas producidas, porcentajes de linfocitos Th1, Th2, Th17 y T reguladores (Treg).
- Análisis de expresión génica (RNA) de mediadores inflamatorios no detectables por técnicas de valoración proteica, por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).
 - Respuesta proliferativa celular al alérgeno *in vitro* en cultivo celular mediante valoración por incorporación de timidina tritiada.

2.2 Muestras de suero

En cada extracción, se obtuvo una alícuota de 5ml en un tubo para la obtención de suero, en el cual se realizaron las siguientes determinaciones en ALK-Abelló S.A.:

- En la visita 1: sIgE a Phl p 1, Phl p 5, Ole e 1, Ole e 9, Cup s 1, Pru p 3, Profilina (Mal d 4), Polcalcina (Che a 3), Art v 1, Bet v 1, Sal k 1, Pla l 1, Par j 2: así como sIgG4 a Phl p 1 y Phl p 5.
- En las siguientes visitas: sIgE a Phl p 1, Phl p 5 y Profilina; así como sIgG4 a Phl p 1, Phl p 5 y Profilina.

Para las determinaciones de sIgE se utilizaron la plataforma ADVIA-Centauro.

Las determinaciones de sIgG4 se realizaron utilizando ensayos de ELISA específicos para cada alérgeno.

- Se realizó un análisis de expresión génica (RNA, por RT-PCR) de mediadores inflamatorios, moléculas de activación y señalización.
-

2.3 Detalles metodológicos de las técnicas utilizadas

A continuación se especifican los detalles metodológicos de las diferentes técnicas mencionadas.

2.3.1 Separación de PBMC

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de muestras de sangre completa de los pacientes, recolectadas por punción venosa en tubos Vacutainer conteniendo heparina sódica (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Las PBMC de los pacientes se separaron en gradiente de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). Las PBMC se incubaron durante 20 horas con extracto de Phleum (a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$). Para el análisis de citocinas, se bloqueó la secreción de proteínas añadiendo 2 $\mu\text{g/ml}$ de brefeldina A (Calbiochem, Billerica, MA, USA) en los cultivos 5 horas antes.

2.3.2 Análisis de las subpoblaciones linfocitarias por inmunofenotipado y por citometría de flujo

Se analizaron los fenotipos de las subpoblaciones celulares de linfocitos, a partir de muestras de sangre completa, por medio de citometría de flujo multiparamétrica. Para ello, se trataron 100 μl de sangre periférica con anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromo (durante 20 minutos a temperatura ambiente), se lisaron los eritrocitos y se fijaron las células con Versalyse (todos los reactivos de Beckman-Coulter, Brea, California, USA). Se

cuantificó a los eosinófilos como la fracción CD15+ CD14- CD16- CD11b+ CD66b+ CD294+ en células de sangre periférica.

Las subpoblaciones celulares fraccionadas se tiñeron con colorante Live/Dead (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e identificaron utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales anti-humanos: anti-CD45 y anti-CD4 marcados con AmCyan (mIgG1; Becton Dickinson, San Diego, California, USA); anti-CD15 (mIgM) y anti-CD127 (mIgG1) marcados con Azul Pacífico (eBioscience, San Diego, California, USA); anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD11b, anti-CD16 y anti-CD66b (todos ellos mIgG1) marcados con isotiocianato de fluoresceína; anti-CD11c y anti-CD56 (mIgG1) marcados con ficoeritrina; anti-CD14 (mIgG2a) y anti-CD45RA (mIgG1) marcados con Rojo de Texas y ficoeritrina (todos ellos de Beckman Coulter); anti-CD4, anti-CD19 (ambos mIgG1), anti-CD152 (mIgG2a) marcados con PC5; anti-CD278, anti-IFN- γ y anti-IL-4 marcados con PE-CY7 (todos mIgG1, eBioscience); anti-IL-5 marcado con alofocianina (IgG2a de rata; Biolegend, San Diego, California, USA); anti-CD294 marcado con Alexa Fluor 647 (IgG2a de rata, BD Bioscience); anti-IL-10 marcado con Alexa Fluor 647 (IgG1 de rata, Biolegend); y anti-CD25 marcado con APC-PC7 (IgG1 de rata; eBioscience). La superficie de las células se tiñó de acuerdo a los protocolos de los fabricantes. Por su parte, se utilizó el kit Intraperm Fix/Perm (BD PharMingen) para la tinción intracelular, de la capacidad de producción de citocinas y de expresión de CTLA-4 (CD152).

Se utilizó un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter) para los análisis de citometría de flujo multidimensional de los fenotipos y la producción de citocinas de los linfocitos. Se utilizó a diario fluorosferas Flow-Check (Beckman Coulter) para comprobar el alineamiento óptico y el rendimiento del sistema de

fluidos del citómetro de flujo. Se llevó a cabo una estandarización en cada ronda de visitas, utilizando las fluorosferas Flow-Check (Beckman Coulter) para reestablecer los ajustes de todos los parámetros de fluorescencia, para asegurar el mantenimiento de los ajustes del instrumento y la consistencia en el tiempo. Se llevó a cabo la compensación con una alicuota de PBMCs humanas congeladas, cultivadas durante la noche y teñidas con anti-CD4 humano, teñido con cada marcador según la combinación de colorantes. Se utilizó el programa ADC (Beckman Coulter) para la compensación automática, verificado por la utilización de las mismas muestras de PBMC marcadas con los anticuerpos en nuestros protocolos, para asegurar que el cálculo automático de los coeficientes fuera satisfactorio.

Por su parte, se utilizó el programa Kaluza (Beckman Coulter) para analizar los datos en modo de lista. Se adquirió 1 millón de eventos y se separó los linfocitos utilizando sus propiedades de dispersión lateral.

2.3.3 Análisis de inmunoglobulinas séricas IgE, IgG4 e IgG1

La determinación de la cifra de IgE específica a alérgenos principales de Phleum, Phl p 1 y Phl p 5, se realizó utilizando la plataforma ADVIA Centauro (Bayer HealthCare, Tarrytown, NY, USA), de acuerdo al método estándar (159 17).

Por su parte, los niveles de IgG1 e IgG4 específica frente a Phl p 1 y Phl p 5 se evaluaron por ELISA (160 18). Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente las muestras de suero de los pacientes (diluidas al 1:10, 1:30 y 1:90) con los alérgenos Phl p 1 y Phl p 5, que previamente habían sido unidos a placas a una concentración de 2 µg/ml. Para las determinaciones de ELISA,

utilizamos anticuerpos monoclonales anti-IgG4 humana (16137), así como anticuerpos anti-IgG1 (Southern Biotech, Birmingham, Ala, USA), ambos conjugados con peroxidasa. Los resultados se obtuvieron a partir de una curva estándar de extracto de *Phleum pratense* y se expresaron en unidades arbitrarias por ml.

2.3.4 Ensayo de la unión al alérgeno facilitada por IgE (FAB)

Se realizó el análisis de la FAB utilizando métodos estándar (162 19). Brevemente, un suero indicador definido, en concreto un pool de sueros de 3 donantes alérgicos a pólenes de gramíneas, que contienen una concentración de IgE específica elevada (>100 kU/ml, medida por método Advia Centauro, ALK-Abelló), se preincuba con extracto alergénico de *Phleum pratense* (a 0, 0.1 y 0.3 µg/ml, a 37°C durante 1 hora), sólo (volumen de alérgeno, indicador y buffer = 1:1:1) o acompañado del suero de los pacientes (volumen de alérgeno, indicador y suero de los pacientes = 1:1:1). A continuación se añaden linfocitos B transformados por VEB (105 células por muestra, volumen de alérgeno, indicador, suero de los pacientes y linfocitos B = 1:1:1:1) y se vuelve a incubar a 4°C durante 1 hora antes de hacer el lavado. La unión a la superficie celular de los complejos de IgE-alérgeno se detecta por citometría de flujo con un anticuerpo policlonal anti-IgE marcado con un isotiocianato de fluoresceína (STAR147F; Serotec, Dusseldorf, Alemania). Todas las muestras de los pacientes se analizaron en duplicado.

2.4 Evaluación de la mejoría clínica de los pacientes tratados con SLIT en tabletas de gramíneas

Con el fin de analizar la eficacia clínica como un indicador del éxito de la terapia, se utilizó la valoración subjetiva de los pacientes. La evaluación clínica subjetiva durante la visita post-estacional, se basó en la comparación entre la estación polínica más reciente y la previa. Se asignó un valor numérico a las preguntas, siguiendo una escala tipo Likert, variando desde -2 (mucho peor que la primavera anterior), -1 (peor), 0 (sin cambios), 1 (mejor) a 2 (mucho mejor). Los valores acumulados en los 2 años de seguimiento resultan en una escala desde -4 (mucho peor ambos años) hasta +4 (mucho mejor de los síntomas en ambos años).

2.5 Estudio estadístico y presentación de datos

Los datos se representan como cajas que muestran la media de la muestra \pm 95% del intervalo de confianza. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con los programas SPSS 17.0 y GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Los parámetros clínicos y demográficos se expresan como la media y el rango. Para compararlos se ha recurrido a las pruebas de Chi-cuadrado y la U de Mann-Whitney.

Salvo que se especifique de otro modo, se utilizó para los parámetros individuales el análisis de varianza de un factor o prueba de ANOVA, con mediciones repetidas y la prueba Dunnett pareada para ensayos longitudinales. Para otro tipo de correlaciones pareadas se ha utilizado las pruebas de Pearson y Fisher.

Por su parte, la relación entre las escalas de puntuación clínica y los parámetros inmunológicos se analizó por medio del coeficiente de correlación de Spearman.

Se consideraron significativos valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

1 Características de los pacientes

Entre los meses de septiembre y octubre de 2009 se reclutaron 58 pacientes en el Hospital Universitario de La Princesa de Madrid, que cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión, y habían firmado el consentimiento informado para participar en el estudio. Los pacientes fueron tratados con GRAZAX® durante 3 años y a continuación se les hizo un seguimiento durante dos años adicionales. Se presentan los datos descriptivos correspondientes a los 58 pacientes que iniciaron el estudio, así como los resultados obtenidos en dos tiempos distintos: tras los dos primeros años de tratamiento (población “per protocol” a los dos años) y los que finalizaron a los 5 años (población “per protocol” a los 5 años).

Las características principales de los pacientes se resumen en la Tabla 1. Se trataba de 28 mujeres (48,3%) y 30 hombres (51,7%) con una edad media (\pm SD) de 35,5 (\pm 9,7) años. La distribución por razas fue de 29 caucásicos (50%), 27 hispanos (46,5%), 1 afroamericano (1,7%) y 1 asiático. Todos padecían de rinoconjuntivitis por alergia a polen de gramíneas, mientras que 32 de ellos (el 56,8%) también tenían asma bronquial, que en ningún caso era grave (padecían desde asma leve intermitente a moderado persistente, escalones 1 a 3 de la GINA). La IgE total de los pacientes mostró una media geométrica de 112,4 kU/L (Q1-Q3 54-271), estando en rango normal ($<$ 100 kU/L) en 27 pacientes. La prueba cutánea a Phleum fue positiva en todos los pacientes, con una pápula de 11 ± 3 mm. Del mismo modo, la IgE a phleum fue también positiva en todos los

pacientes, por encima de 0.7 kU/L (al ser un criterio de inclusión), con una media geométrica de 13,5 kU/L (Q1-Q3 6,2-27,79).

De entre los pacientes, 42 mostraban otras sensibilizaciones frente a inhalantes adicionales diferentes de los pólenes; además, la mayor parte mostraban sensibilización a otros pólenes (ver más adelante). Es interesante que 19 de nuestros pacientes (el 32,8%) presentaban sensibilización subclínica o alergia a alimentos vegetales, sobre todo a frutas como el melón y el melocotón. En concreto, 18 pacientes tenían historia de síndrome de alergia oral (SAO) por frutas, mientras que uno mostraba sensibilización a kiwi. Otros 2 referían SAO en relación con marisco.

Estas características generales de los pacientes se corresponden a la población que habitualmente se atiende en nuestras Consultas Externas de Alergología del Hospital Universitario de La Princesa, proveniente en su mayoría del Área Sanitaria 2 de la Comunidad de Madrid, en la que la alergia más prevalente es a polen de gramíneas.

Tabla 1. Características generales de los pacientes

Nº	Edad / sexo	Alergia respiratoria	Prick Phleum*	IgE Phleum#	Otras sensibilizaciones	Alergia alimentaria
03	21/V	RC	14	41,0	Animales	SAO frutas
04	52/V	Rc/asma	11	52,8	Perro/Ácaros	SAO mariscos
05	31/F	Rc	11	27,2	Perro	SAO frutas
06	26/F	RC	9	26,5	Alternaria	SAO frutas
07	27/F	RC	10	2,1	Perro/Alternaria	
08	34/F	RC/asma/AIE	16	48,8	Perro/Alternaria	Sensibilización anisakis
09	26/V	RC	8	7,2	Perro/Ácaros	SAO frutas
10	36/V	RC	10	12,5	Gato	
11	40/V	RC/asma	14	14,1	Perro	SAO melón
12	40/V	RC	16	19,3	Perro/Ácaros	
13	34/F	RC/asma	8	52,8		Anisakis
14	30/V	RC	12	9,8		
15	29/F	RC	12	5,16	Animales	
16	30/V	RC/asma	11	15,9	Perro	
17	18/F	RC/asma	10	31,9	Perro	
18	26/V	RC/asma	10	34,6	UA idiopática	Sensibilización Kiwi/Anisakis
19	23/V	RC/asma	8	10,4	Alternaria	DA
20	57/F	RC/asma	15	4,7	Animales/Ácaros/Alternaria	SAO frutas
21	45/F	RC/asma	13	16,0	Perro	SAO frutas
22	40/V	RC/asma	10	6,1	Perro/Ácaros	
23	36/V	RC	7	2,7	Gato	
24	35/V	RC	9	34,7	Ácaros	
25	43/F	RC	20	24,6		SAO frutas
26	47/F	RC	10	10,3	Perro	
27	48/F	RC/asma	13	24,0	Ácaros	Anisakis
28	38/V	RC	8	6,9	Gato	
29	37/V	RC/asma	19	27,9		
30	53/F	RC/asma	17	67,5	Perro/Ácaros	
31	28/V	RC/asma	15	86,4	Perro/Ácaros/Alternaria	SAO frutas
32	20/F	RC/asma	15	6,1		
33	34/V	RC/asma	8	32,9	Animales/Ácaros	
34	28/V	RC	9	6,6		
35	23/V	RC	9	18,5		
36	25/V	RC/asma	7	5,1	Gato	
37	36/F	RC/asma	11	4,0	Perro	
38	42/F	RC	10	13,5		
39	52/V	RC	8	14,8		SAO frutas/Alergia a cebolla
40	34/F	RC/asma	11	4,0		
41	30/F	RC/asma	10	12,7		SAO frutas
42	56/F	RC/asma	10	25,6	Gato/Ácaros	SAO frutas
43	28/F	RC	10	5,4		
44	47/F	Rc	10	10,6		
45	44/F	RC/asma	10	50,7		SAO marisco
46	46/V	RC/asma	7	0,7		
47	42/V	RC	14	29,4	Perro	
48	27/F	RC/asma	9	16,7	Animales	DA/SAO frutas y tomate
49	32/V	RC	9	7,0	Animales	
50	42/F	RC/asma	10	14,8	Gato	DA
51	37/V	RC	9	9,3	Perro/Ácaros	
52	55/V	RC	12	39,1		SAO melón
53	27/V	RC/asma	9	4,7	Ácaros	
54	37/F		8	2,3		
55	29/F	RC/asma	7	0,7	Perro	SAO melocoton
56	25/V	RC/asma	17	100,0	Ácaros	
57	40/V	RC/asma	11	100,0		
58	38/F	RC/asma	12	5,1		SAO frutas
59	31/V	RC/asma	10	18,0		SAO kiwi
60	25/F	RC	10	17,3		SAO frutas y frutos secos

*Diámetro medio en mm de la pápula de la prueba cutánea en prick, realizado con extracto comercial de *Phleum pratense*

#IgE específica sérica a *Phleum* comercial en kU/L determinada por ImmunoCAP

Nº, número de paciente; V, hombre; F, mujer; RC, rinoconjuntivitis; UA, urticaria-angioedema; SAO, síndrome de alergia oral; DA, dermatitis atópica; AIE, asma inducido por ejercicio.

A todos los pacientes se les efectuó prueba cutánea en prick con una batería de inhalantes y alimentos, cuyos resultados se resumen en la Tabla 2. De entre ellos, 38 pacientes (el 65,5%) mostraron sensibilización a olivo, con una pápula de $7,1 \pm 2,2$ mm, 34 a arizónica (58,6%), con pápula de $6,1 \pm 1,8$ mm. Además, de entre nuestros pacientes, 46 (el 79,3%) tenían sensibilización a otros pólenes distintos de los ya mencionados, que se resume en 31 sensibilizados a chenopodium, 19 a abedul, 16 a parietaria, 12 a artemisia y 11 a salsola.

Atendiendo al resultado de las pruebas cutáneas, 31 pacientes (53,4%) mostraban sensibilización a epitelios de animales (24 de ellos a perro y 13 a gato, con pápulas de $5,2 \pm 1,8$ y de $6,8 \pm 2,8$ mm, respectivamente), 15 (25,9%) a ácaros del polvo (pápula de $7,1 \pm 3,1$ mm) y 6 (10,3%) a hongos de la humedad (alternaria, pápula de $6,7 \pm 2,2$).

Tabla 2. Resultados de las pruebas cutáneas

Nº	Art	Bet	Cup	Sal	Par	Pla	Che	Man	Mel	Ole	Alt	Der	Gat	Per
3	5	4	7	4	3	15	9	0	0	14	0	0	13	8
4	0	0	7	4	3	5	6	0	0	7	0	7	0	5
5	5	5	0	5	0	10	8	0	3	8	0	0	0	6
6	0	0	3	0	0	0	0	0	0	10	9	0	0	0
7	0	0	6	0	0	10	0	0	0	9	9	0	0	3
8	0	4	4	0	0	8	6	0	0	0	3	0	0	6
9	0	9	6	0	5	6	3	0	0	6	0	7	0	5
10	0	0	5	0	5	6	3	0	0	10	0	0	5	0
11	4	4	0	0	3	7	4	0	0	0	0	0	0	6
12	6	6	9	3	0	11	8	0	0	8	0	15	0	6
13	0	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0
14	0	0	0	0	3	7	5	0	0	8	0	0	0	0
15	0	0	10	0	3	7	3	0	0	5	0	0	5	3
16	0	0	0	0	0	6	0	0	0	7	0	0	0	5
17	0	0	9	0	7	6	3	0	0	0	0	0	0	4
18	0	0	6	0	7	7	7	0	0	8	0	0	0	0
19	5	4	4	0	0	11	4	0	0	10	7	0	0	0
20	5	3	4	7	6	9	6	5	5	6	6	7	9	9
21	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
22	0	10	5	0	0	7	6	0	0	8	0	12	0	8
23	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0
24	0	0	7	0	3	3	4	0	0	4	0	4	0	0
25	11	6	8	5	6	21	10	0	0	8	0	0	0	0
26	0	0	4	0	0	5	4	0	0	0	0	0	0	3
27	0	0	7	0	0	5	5	0	0	0	0	10	0	0
28	0	0	5	0	4	4	0	0	0	9	0	0	7	0
29	0	0	0	0	8	6	9	0	0	0	0	0	0	0
30	6	0	0	0	0	5	6	0	0	0	0	4	0	6
31	0	5	0	0	9	7	5	0	0	5	6	5	0	9
32	0	0	0	9	0	6	8	0	0	10	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	7	6	4
34	0	0	6	10	0	9	7	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	5	0	3	6	0	0	0	4	0	0	5	0
37	0	0	0	0	0	5	4	0	0	7	0	0	0	4
38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	0	4	0	0	0	10	7	0	0	8	0	0	0	0
40	0	0	7	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
41	0	5	5	5	0	11	9	0	0	5	0	0	0	0
42	0	0	5	0	0	6	4	0	0	6	0	7	5	0
43	0	6	7	0	0	13	5	0	0	4	0	5	0	0
44	0	0	0	0	0	4	4	0	0	9	0	0	0	0
45	5	0	6	0	0	9	0	0	4	0	0	0	0	0
46	0	4	0	0	0	5	4	0	0	0	0	0	0	0
47	0	0	9	0	4	6	6	0	0	8	0	0	0	4
48	5	6	6	5	0	10	4	0	0	6	0	0	11	6
49	0	0	0	0	0	5	6	0	0	5	0	0	4	3
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0
51	0	0	7	0	0	5	6	0	0	7	0	4	0	5
52	0	4	0	5	0	7	4	0	0	3	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0	5	0	0	0	7	0	5	0	0
54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	4	0	0	6	0	0	0	0	4
56	0	0	6	0	0	6	4	0	0	0	0	8	0	0
57	5	0	8	0	0	9	0	0	0	9	0	0	0	0
58	0	7	3	0	0	6	6	6	5	6	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0	8	6	0	0	5	0	0	0	0
60	0	0	0	0	4	7	3	0	0	4	0	0	0	0

Nº, número de paciente; Art, *Artemisia vulgaris*; Bet, *Betula verrucosa*; Cup, *Cupressus arizónica*; Sal, *Salsola kali*; Par, *Parietaria judaica*; Pla, *Plantago lanceolata*; Che, *Chenopodium alba*; Mal, *Malus domestica*; Mel, *Prunus persica*; Ole, *Olea europaea*; Alt, *Alternaria alternata*; Der, *Dermatophagoides mezcla*; Gat, *Felis domesticus*; Per, *Canis familiaris*.

Se determinó la cifra de IgE específica a componentes de pólenes por método ADVIA en todos los pacientes (Tabla 3). El 44,8% (n=26) fueron positivos a Ole e 1, con una media de 4,5 kU/L (Q1-Q3 1,1-10,4), mientras que sólo uno de ellos mostró una discreta sensibilización a alérgeno minoritario de olivo Ole e 9. El 36,2% (n=21) de los pacientes estaban sensibilizados a Cup s 1, con una media de 4,1 kU/L (Q1-Q3 1,2-6-8). En cuanto a otros componentes de pólenes, 6 pacientes estaban sensibilizados al alérgeno principal de Plantago Pla l 1, uno de los cuales mostró niveles altos de IgE; 3 lo estaban al alérgeno principal de Salsola, Sal k 1; 2 pacientes fueron positivos al alérgeno principal de artemisia Art v 1; y otros 2 al de abedul Bet v 1 (uno de los cuales mostraba un título muy elevado y se trataba de un paciente de origen alemán). Ninguno de los pacientes mostró sensibilización al alérgeno de Parietaria, Par j 2, ni al componente de chenopodiáceas Che a 3.

Tabla 3. Resultados de IgE específica sérica en kU/L, determinados por ADVIA

Nº	Artv1	Betv1	Cups1	Olee9	Olee1	Parj2	Plal1	Chea3	Prup3	Salk1
3	0,02	0,00	6,77	0,01	3,62	0,00	0,02	0,01	0,00	0,01
4	0,08	0,01	0,00	0,05	96,25	0,00	0,01	0,03	0,01	0,05
5	0,07	0,00	0,00	0,00	2,54	0,01	0,04	0,02	0,02	0,00
6	0,02	0,02	0,01	0,01	10,75	0,01	0,04	0,00	0,00	0,00
7	0,08	0,00	1,25	0,00	1,41	0,00	2,34	0,01	0,00	0,00
8	0,10	0,01	0,60	0,01	0,09	0,00	0,03	0,00	0,01	0,06
9	0,06	0,27	1,22	0,07	140,01	0,04	0,05	0,00	0,00	0,02
10	0,04	0,00	0,04	0,04	4,59	0,00	0,03	0,02	0,00	0,04
11	0,05	0,04	0,03	0,01	0,03	0,00	0,03	0,04	0,02	0,05
12	0,07	0,01	26,31	0,01	0,02	0,01	6,72	0,02	0,03	0,04
13	0,10	0,21	1,22	0,02	0,05	0,00	0,07	0,00	0,02	0,00
14	0,02	0,00	0,01	0,00	0,46	0,00	0,02	0,02	0,01	0,00
15	0,01	0,00	5,34	0,03	19,10	0,02	0,03	0,01	0,00	0,01
16	0,13	0,00	0,00	0,00	0,03	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01
17	0,02	0,00	5,68	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00
18	0,03	0,02	2,34	0,06	64,17	0,03	0,02	0,01	0,01	0,05
19	0,01	0,01	0,07	0,03	1,20	0,06	0,05	0,06	0,00	0,08
20	0,07	0,00	0,00	0,05	0,03	0,00	0,09	0,07	0,21	0,03
21	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
22	0,10	151,56	0,09	0,07	31,92	0,01	0,04	0,01	0,02	0,00
23	0,00	0,00	1,46	0,02	0,00	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01
24	0,08	0,03	17,72	0,01	0,53	0,00	0,02	0,02	0,00	0,77
25	3,13	0,00	5,59	0,03	9,34	0,05	0,01	0,01	0,00	0,02
26	0,05	0,00	0,15	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00
27	0,03	0,01	4,15	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,00	0,03
28	0,06	0,00	0,32	0,00	0,85	0,02	0,03	0,00	0,01	0,01
29	0,08	0,03	0,02	0,02	0,00	0,00	0,03	0,04	0,03	0,01
30	0,06	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,02
31	0,02	0,03	0,00	0,00	0,01	0,00	0,03	0,01	0,02	0,00
32	0,00	0,01	0,07	0,01	2,81	0,00	0,00	0,00	0,00	12,15
33	0,03	0,03	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,04	0,00	0,03
34	0,01	0,01	6,38	0,00	0,00	0,00	0,97	0,03	0,00	8,89
35	0,07	0,00	0,03	0,02	0,14	0,01	0,04	0,00	0,01	0,03
36	0,05	0,02	0,37	0,69	0,12	0,00	0,02	0,03	0,00	0,01
37	0,02	0,00	0,04	0,00	13,45	0,00	0,11	0,01	0,00	0,00
38	2,73	0,03	0,19	0,00	0,10	0,00	0,02	0,00	0,83	0,05
39	0,02	0,02	0,00	0,01	1,62	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01
40	0,02	0,02	2,90	0,00	0,05	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00
41	0,04	0,00	0,72	0,00	0,05	0,00	5,08	0,00	0,00	0,02
42	0,04	0,00	0,16	0,01	0,04	0,00	0,02	0,03	0,00	0,02
43	0,07	0,60	0,97	0,00	0,00	0,00	51,51	0,00	0,01	0,00
44	0,07	0,02	0,08	0,00	4,42	0,03	0,01	0,01	0,00	0,07
45	0,00	0,00	0,11	0,01	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00
46	0,03	0,01	0,04	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02
47	0,01	0,02	8,25	0,00	6,64	0,00	0,05	0,02	0,00	0,01
48	0,06	0,02	0,24	0,01	0,00	0,02	0,07	0,01	0,00	0,02
49	0,06	0,00	0,03	0,04	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00
50	0,05	0,07	0,07	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02	0,01	0,01
51	0,00	0,01	2,48	0,00	0,39	0,03	0,02	0,01	0,00	0,02
52	0,00	0,00	0,06	0,01	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,02
53	0,02	0,00	0,05	0,01	1,07	0,04	0,04	0,04	0,02	0,03
54	0,03	0,00	0,00	0,01	10,06	0,03	0,01	0,00	0,00	0,01
55	0,02	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00	0,04	0,00	0,11	0,02
56	0,05	0,00	36,93	0,03	0,00	0,00	0,04	0,01	0,01	0,04
57	0,04	0,01	8,74	0,03	6,30	0,01	0,01	0,00	0,02	0,05
58	0,03	0,02	0,00	0,05	5,65	0,02	0,02	0,00	0,16	0,01
59	0,04	0,01	0,01	0,03	0,49	0,01	0,58	0,00	0,01	0,02
60	0,07	0,00	0,02	0,04	0,00	0,00	0,03	0,02	0,00	0,03

Nº, número de paciente; Art v 1, alérgeno principal de artemisia; Bet v 1, alérgeno principal de abedul; Cup s 1; alérgeno principal de ciprés; Ole e 9, glucanasa de olivo; Ole e 1, alérgeno principal de olivo; Par j 2, alérgeno principal de parietaria; Pla l 1, alérgeno principal de plantago; Che a 3, alérgeno principal de chenopodium; Pru p 3, LTP de melocotón; Salk 1, alérgeno principal de salsola.

En lo que respecta a los alérgenos principales de Phleum, Phl p 1 y Phl p 5, así como a profilina de palmera Pho d 2, se determinó por ADVIA los niveles tanto de IgE como de IgG4 en todos los pacientes al inicio del estudio (Tabla 4). De los 58 pacientes, 55 mostraron IgE positiva a Phl p 1 (94,8%), con una media de 9,2 kU/L, (Q1-Q3 4,8-20,6) mientras que 32 fueron positivos a IgE a Phl p5 (55,1%), con una media de 8,8 kU/L (Q1-Q3 3,6-19,3). Sólo 13 pacientes (22,4%) mostraron IgE a la profilina de palmera, con una media de 2,5 kU/L (Q1-Q3 1,0-5,0), de los cuales 11 referían síntomas en relación con la ingestión de frutas, sobre todo melón, y ninguno de ellos abandonó el estudio por efectos adversos relacionados con el tratamiento.

De entre los pacientes, 2 mostraron sensibilización a Phl p 5 en ausencia de IgE a Phl p1. Del mismo modo, un paciente fue negativo a todos los componentes de Phleum testados, a pesar de tener una IgE a Phleum total de 4 KU/L, por lo que probablemente estaba sensibilizado a otros componentes de Phleum.

En cuanto a la sensibilización IgG4 a componentes de Phleum, 29 pacientes (50%) mostraron resultado positivo a Phl p1, con una media de 0,09 kU/L (Q1-Q3 0,04-0,22). Mientras tanto, en 28 sujetos (48,2%) se detectaba IgG4 a Phl p 5, con una media de 0,13 kU/L (Q1-Q3 0,08-0,20); y 14 individuos (24,1%) a profilina de palmera, con una media de 0,25 kU/L (Q1-Q3 0,14-0,48).

Tabla 4. Resultados de ADVIA (kU/L): slgE y slgG4 a Phl p 1, Phl p 5 y a profilina (Pho d 2).

Nº	slgE			slgG4		
	Phl p 1	Phl p 5	Pho d 2	Phl p 1	Phl p 5	Pho d 2
3	16,29	22,81	30,52	0,13	0,222	0,162
4	12,77	19,30	0,01	1,256	1,167	0,005
5	11,31	27,62	7,48	0,144	0,316	0,344
6	1,68	0,00	0,01	0,003	0,00	0,001
7	3,18	1,99	0,00	0,010	0,051	0,002
8	25,42	23,41	0,00	0,102	0,186	0,004
9	20,14	0,05	0,00	0,008	0,00	0,000
10	12,52	0,03	0,00	0,034	0,00	0,000
11	10,68	18,69	1,23	0,148	0,079	0,554
12	18,94	0,33	36,66	0,146	0,131	0,574
13	0,08	52,77	0,02	0,014	0,125	0,000
14	8,89	6,52	0,95	0,058	0,050	0,556
15	32,30	0,21	0,00	0,085	0,00	0,031
16	7,67	8,27	0,00	0,013	0,019	0,016
17	29,88	15,43	0,03	0,118	0,202	0,000
18	34,46	0,09	0,01	0,119	0,00	0,000
19	10,42	0,02	4,46	0,000	0,008	0,266
20	4,64	0,02	0,00	0,004	0,00	0,014
21	9,85	5,81	0,01	0,057	0,222	0,000
22	0,36	0,02	0,00	0,001	0,000	0,023
23	0,71	1,95	0,00	0,000	0,000	0,000
24	34,02	0,90	0,07	0,035	0,000	0,000
25	35,69	0,04	5,23	0,218	0,040	0,291
26	0,09	6,89	0,00	0,000	0,165	0,000
27	15,38	8,61	0,00	0,027	0,050	0,000
28	6,87	0,01	0,00	0,094	0,000	0,000
29	32,69	0,02	0,00	0,000	0,000	0,000
30	29,37	38,14	0,00	0,000	0,008	0,000
31	51,46	34,93	0,40	0,343	0,377	0,051
32	9,93	1,48	0,02	0,000	0,000	0,000
33	19,86	13,07	0,01	0,000	0,000	0,000
34	10,99	1,85	0,01	0,000	0,000	0,000
35	8,88	9,63	0,01	0,268	0,221	0,402
36	5,85	0,06	0,00	0,000	0,000	0,000
37	0,04	0,02	0,00	0,000	0,000	0,000
38	15,29	0,07	0,01	0,016	0,000	0,000
39	16,68	2,23	0,87	0,032	0,154	0,402
40	4,02	0,01	0,00	0,000	0,000	0,000
41	12,67	0,08	4,32	0,018	0,000	0,069
42	14,70	24,53	0,00	0,103	0,128	0,006
43	1,37	3,63	0,01	0,000	0,000	0,006
44	3,75	2,95	0,00	0,037	0,017	0,006
45	50,70	0,01	0,00	0,187	0,000	0,007
46	1,72	0,01	0,03	0,000	0,006	0,022
47	21,14	8,28	0,00	0,047	0,118	0,007
48	13,17	5,63	6,41	0,262	0,163	0,132
49	6,12	0,04	0,04	0,000	0,000	0,006
50	22,97	0,28	0,00	0,000	0,000	0,007
51	2,44	6,83	0,08	0,016	0,109	0,019
52	30,80	0,07	2,23	0,239	0,078	0,125
53	4,26	0,01	0,02	0,000	0,000	0,016
54	2,31	0,02	0,01	0,000	0,000	0,000
55	2,14	0,03	0,00	0,000	0,000	0,000
56	94,46	90,88	0,05	0,338	0,712	0,000
57	15,16	17,06	0,00	0,023	0,150	0,000
58	5,03	0,06	0,00	0,026	0,005	0,002
59	5,61	12,42	4,44	0,027	0,130	0,511
60	81,50	106,41	0,03	0,241	0,206	0,017

Nº, número de paciente; Phl p 1, alérgeno 1 de Phleum; Phl p 5, alérgeno 5 de Phleum; Pho d 2, profilina de palmera (*Phoenix datylifera*)

De los 58 pacientes que comenzaron el estudio, completaron los 2 primeros años 38 de ellos y finalizaron los 5 años 30 pacientes. La Tabla 5 resume los motivos de abandono y la última visita que completaron los 28 pacientes que no lo finalizaron. En concreto: en 12 pacientes el motivo de abandono fue la pérdida de seguimiento; en 5 el cambio de residencia; en 4 por efectos adversos en posible relación con la medicación del estudio; en 2 casos por efectos adversos no relacionados con la medicación, uno de ellos fue considerado un efecto adverso grave (tromboembolismo pulmonar por trastorno hereditario de coagulación, no diagnosticado previamente), y el otro no grave (dismenorrea); y en 5 sujetos por otras causas (3 no quisieron continuar por motivos personales y en 2 individuos el investigador decidió que no debían seguir por incumplir el tratamiento).

El detalle del número de pacientes que seguían en el estudio por visita se muestra en la Figura 3, a la vez que el diagrama de flujo de la Figura 4 resume el número y las causas de abandono de los pacientes a lo largo del estudio.

Tabla 5. Motivos de abandono y visita en la que tuvo lugar.

Nº	Visita*	Motivo de abandono
03	5	Pérdida de seguimiento
06	11	Cambio de residencia
09	5	Incumplidor
10	7	Incumplidor
12	9	Pérdida de seguimiento
17	8	Pérdida de seguimiento
18	12	Cambio de residencia
24	12	Cambio de residencia
26	3	Efectos adversos (astenia)
27	3	Efectos adversos (edema sublingual)
29	3	Pérdida de seguimiento
30	7	Pérdida de seguimiento
34	4	Pérdida de seguimiento
36	14	Cambio de residencia
37	5	Pérdida de seguimiento
38	7	Efectos adversos (pirosis, dolor abdominal y sensación de cuerpo extraño en esófago)
40	3	Pérdida de seguimiento
43	3	No quiere seguir por sangrado menstrual
44	3	Pérdida de seguimiento
45	5	No quiere continuar
46	14	Cambio de residencia
47	8	Pérdida de seguimiento
49	7	Decisión investigador (alteración de coagulación)
50	4	Pérdida de seguimiento
53	3	Efectos adversos (pirosis y epigastralgia)
56	10	No quiere seguir
58	3	Pérdida de seguimiento
60	10	No quiere seguimiento

*Última visita realizada por el paciente.
 Nº, número de paciente.

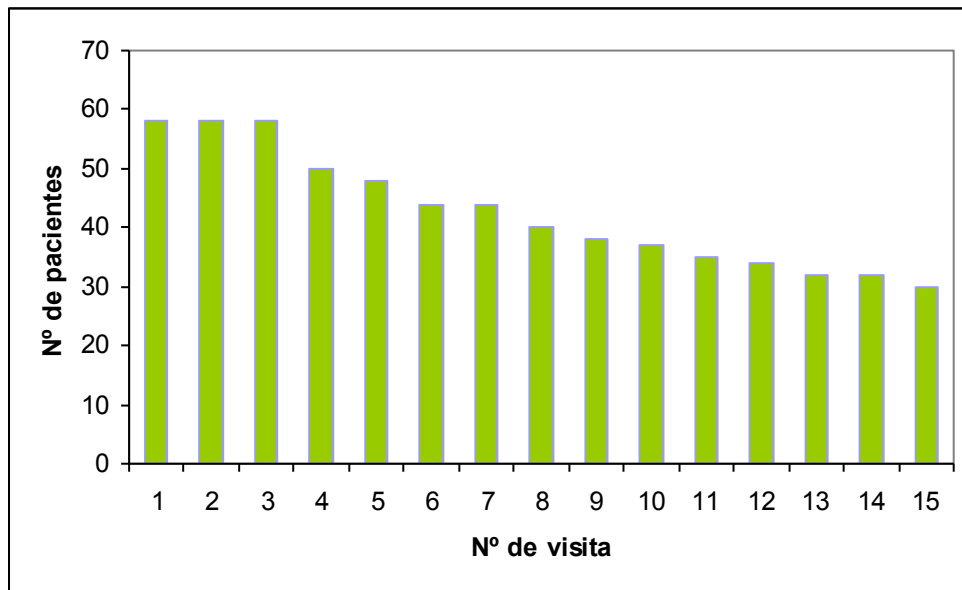


Figura 3. Número de pacientes que siguen en estudio por visita



Figura 4. Resumen de las causas de abandono durante el estudio

2 Cambios inmunológicos en respuesta a la SLIT de gramíneas

A continuación se resumen los principales cambios inmunológicos detectados en respuesta al tratamiento con SLIT de gramíneas.

2.1 Respuesta inmune humoral alérgeno-específica

Para evaluar la respuesta inmune humoral al tratamiento, se midieron los niveles de Ig alérgeno-específicas (sIgE, sIgG₄, sIgG₁), mediante la cuantificación de la reactividad sérica individual de los pacientes a los alérgenos principales de *Phleum* (Phl p 1 y Phl p 5), a lo largo del periodo de tratamiento y seguimiento (163,164).

En el 92.5% de los pacientes se observó un aumento en la sIgE (frente a Phl p 1 + Phl p 5) al mes de iniciar el tratamiento, de hasta 30 veces respecto a la cifra basal, seguido de una reducción progresiva y supresión del aumento estacional en la IgE sérica (Figura 5). En el 70% de los pacientes se detectó una reducción en la sIgE (frente a Phl p 1 + Phl p 5) superior al 25% en el mes 4, al compararlo con el mes 1 tras el inicio del tratamiento. Al primer año, el 85% de los pacientes mostró una reducción en los niveles de sIgE frente a *Phleum* de al menos el 50%, al compararlo con el mes 1, mientras que en el 5% no varió y en el restante 10% se observó un aumento sustancial de la sIgE a lo largo del tratamiento (Figura 6).

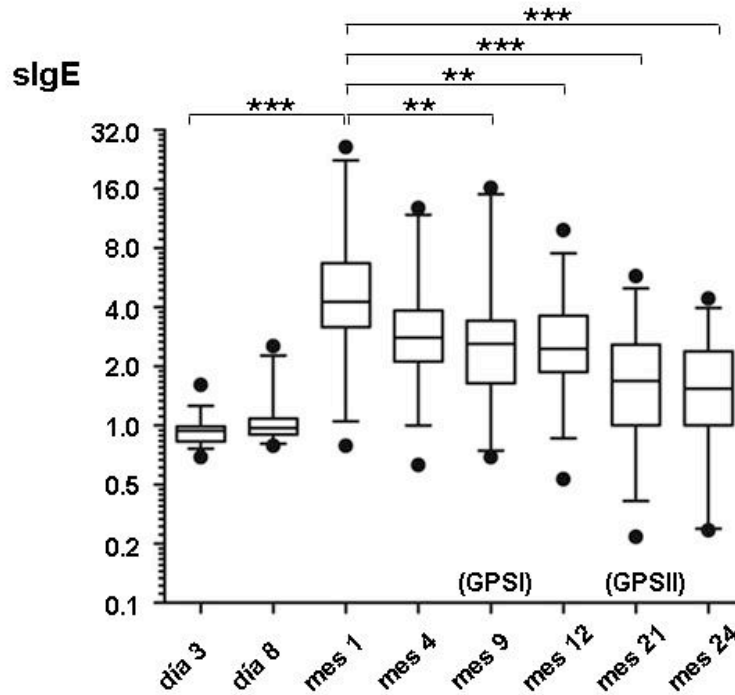


Figura 5. Cifras de slgE frente a *Phleum* (Phl p 1 + Phl p 5) durante los 2 años de tratamiento con SLIT (n=40). Los niveles se expresan como el n° de veces que cambian con respecto a los basales. Las barras muestran la media \pm 95% del intervalo de confianza. GPSI, primera estación polínica; GPSII, segunda estación polínica. ** p < 0.01, *** p < 0.001

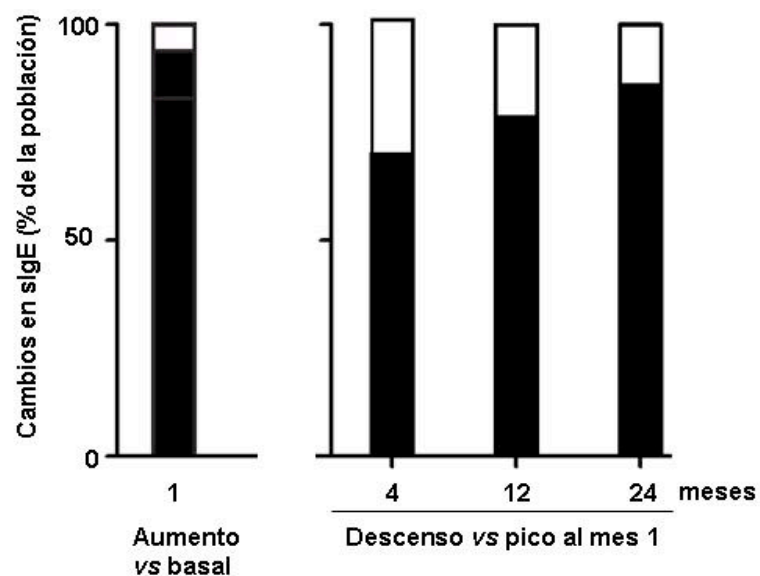


Figura 6. Porcentaje de pacientes que mostraron cambios significativos en las cifras de slgE (frente a Phl p 1 + Phl p 5) a lo largo de los 2 años de tratamiento

La reducción en la producción de sIgE se mantuvo a lo largo de de los 3 años de tratamiento y durante los 2 años de seguimiento posterior (Figura 7), aunque se observó variabilidad individual. La supresión del pico fisiológico estacional de sIgE observada en los 2 primeros años, se mantuvo en la GPSIII. A final del tratamiento (GPSIII), el 46 % de los pacientes mostraban niveles de sIgE similares o menores a los valores basales (T0), proporción que alcanzó el 76% en la GPSIV, que fue el momento con menores cifras de sIgE. A partir de este momento, el 33% de los pacientes mostraron un aumento en la sIgE y al final del ensayo se observó una elevación de los valores de sIgE de entre 2 y 5 veces al compararlos con los basales. En el resto de los pacientes (67%) la sIgE permaneció por debajo de los valores constatados antes y durante el tratamiento con SLIT (Figura 7, línea de puntos).

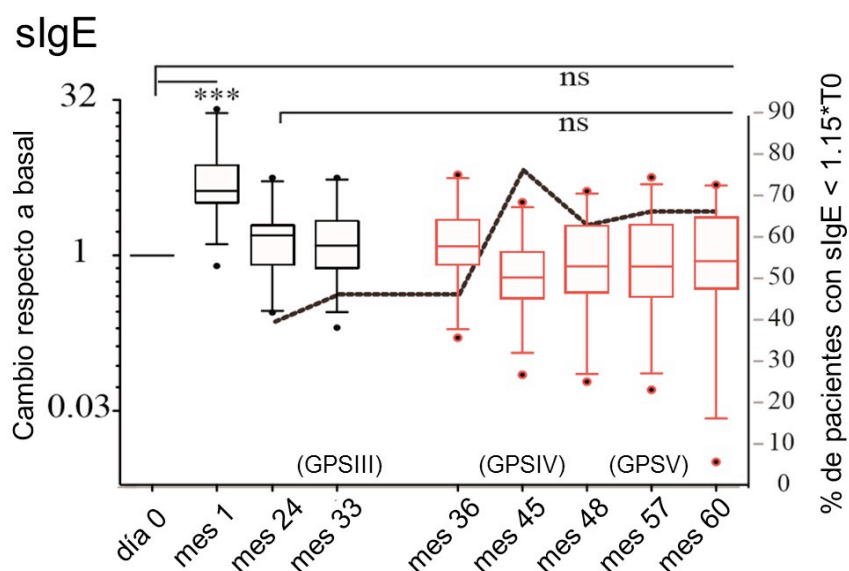


Figura 7. Modulación de la respuesta sIgE (frente a Phl p 1 + Phl p 5) a lo largo de los 5 años del estudio. Los niveles de sIgE se expresan como el nº de veces que cambian con respecto a los basales, mientras que la línea de puntos indica el porcentaje de la población que muestra niveles de sIgE menores que en T0. Las barras muestran la media \pm 95% del intervalo de confianza. GPSIII, tercera estación polínica; GPSIV, cuarta estación polínica; GPSV, quinta estación polínica. *** $p < 0.001$, ns no significativa.

También se cuantificó la cifra de IgG₄ alérgeno-específica (frente a Phl p 1 + Phl p 5) en el suero de los pacientes a lo largo del tratamiento, en la Figura 8 se muestra el cambio en el nivel de sIgG₄ con respecto al basal. Se detectó un aumento en la sIgG₄ a *Phleum* en el 87% de los pacientes. Los cambios en la sIgG₄ sérica dependieron del tiempo en la muestra estudiada, de tal forma que fue suficiente un mes de tratamiento para detectar un aumento (≥ 1.5 veces el nivel basal) en sIgG₄ en el 58% de los pacientes, proporción que alcanzó el 75% en el mes 4 y el 87% en el mes 24. En el restante 13% de los pacientes, no se objetivó cambios en la sIgG₄ durante los 2 primeros años de tratamiento (Figura 9).

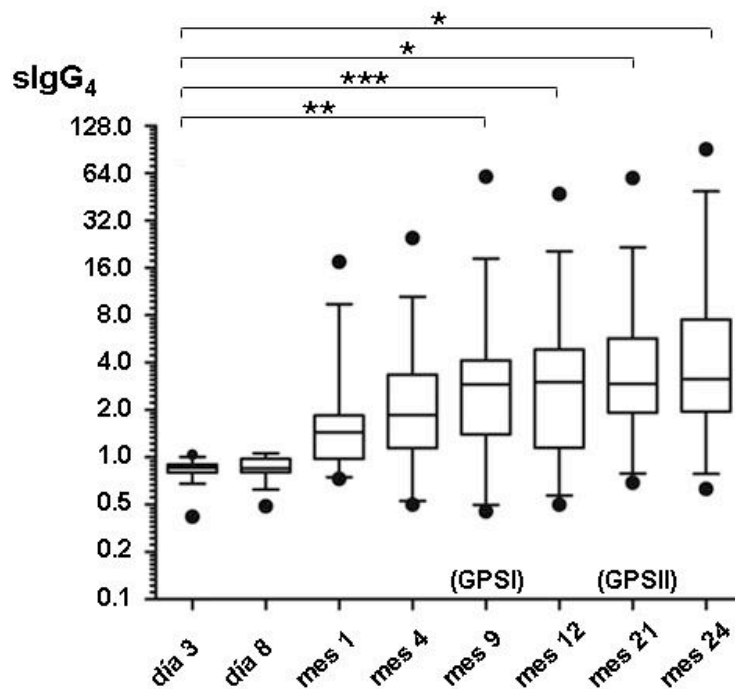


Figura 8. Cifras de sIgG₄ frente a *Phleum* (Phl p 1 + Phl p 5) durante los 2 años de tratamiento con SLIT (n=40). Los niveles se expresan como el n° de veces que cambian con respecto a los basales. Las barras muestran la media \pm 95% del intervalo de confianza. GPSI, primera estación polínica; GPSII, segunda estación polínica. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

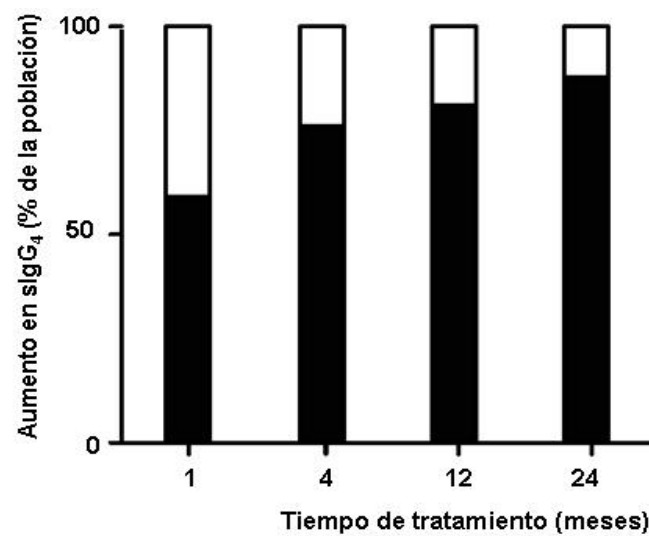


Figura 9. Porcentaje de pacientes que mostraron un aumento significativo en las cifras de sIgG₄ (frente a Phl p 1 + Phl p 5) a lo largo de los 2 años de tratamiento.

Los niveles de sIgG₄ fueron disminuyendo a partir del segundo año y hasta finalizar el seguimiento (Figura 10), pero permanecieron por encima que antes de recibir SLIT en el 60% de los pacientes (Figura 10, línea de puntos).

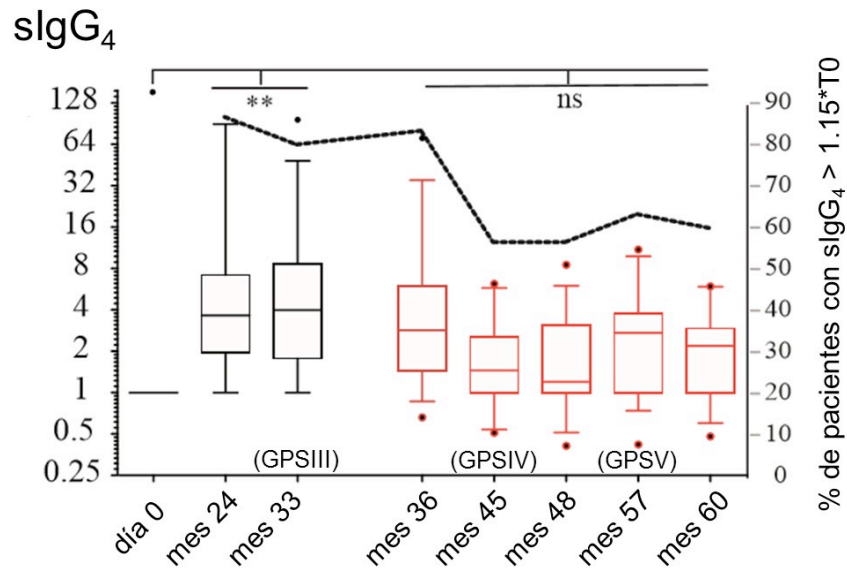


Figura 10. Modulación de la respuesta sIgG4 (frente a Phl p 1 + Phl p 5) a lo largo de los 5 años del estudio. Los niveles de sIgG4 se expresan como el n° de veces que cambian con respecto a los basales, mientras que la línea de puntos indica el porcentaje de la población que muestra niveles de sIgG4 menores que en T0. Las barras muestran la media \pm 95% del intervalo de confianza. GPSIII, tercera estación polínica; GPSIV, cuarta estación polínica; GPSV, quinta estación polínica. ** $p < 0.01$, ns no significativa.

Del mismo modo, se cuantificó la cifra de IgG₁ alérgeno-específica (frente a Phl p 1 + Phl p 5) en el suero de los pacientes. La sIgG₁ fue detectable a nivel basal tan solo en el 60% de los pacientes. Únicamente quienes presentaban valores basales delectables mostraron un aumento significativo en el nivel de sIgG₁, desde la GPSI (la estación polínica del primer año) hasta el final del estudio (Figura 11). Al mes 1 de tratamiento, se detectó un aumento (≥ 1.5 veces el nivel basal) en el 18% de los pacientes, al mes 4 en el 36%, alcanzando un máximo del 56% de la población estudiada en los meses 9 a 12, que fue cuando los pacientes individuales también mostraron los niveles mayores de sIgG₁. Durante el segundo año, el 75% de estos pacientes mostraron una reducción gradual en las cifras de sIgG₁, aunque seguían siendo significativamente superiores a las basales (Figura 12). El restante 40% de los

pacientes no tenían slgG_1 detectable, ni en el tiempo 0 ni en cualquier otro tiempo a lo largo de los 2 años de tratamiento.

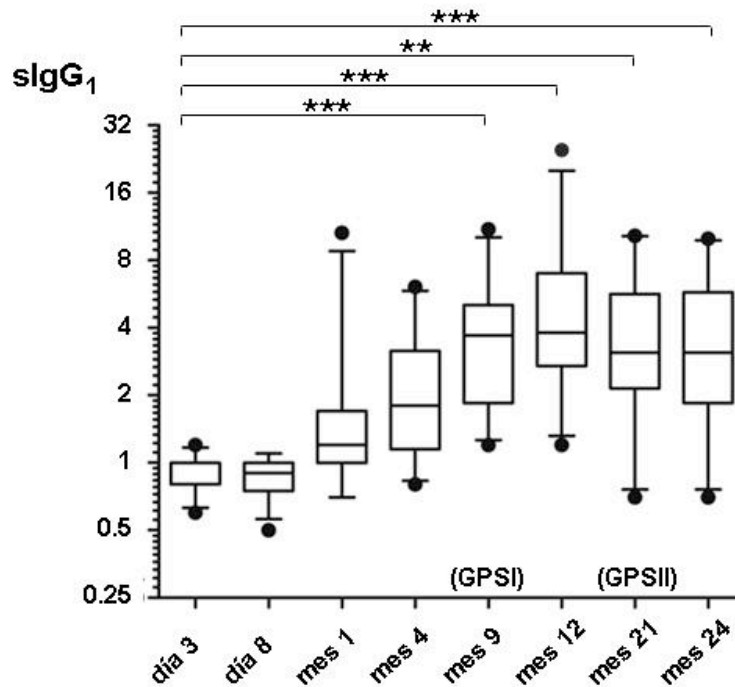


Figura 11. Cifras de slgG_1 frente a *Phleum* (Phl p 1 + Phl p 5) durante los 2 años de tratamiento con SLIT (n=40). Los niveles se expresan como el n° de veces que cambian con respecto a los basales. Las barras muestran la media \pm 95% del intervalo de confianza. GPSI, primera estación polínica; GPSII, segunda estación polínica. ** p < 0.01, *** p < 0.001

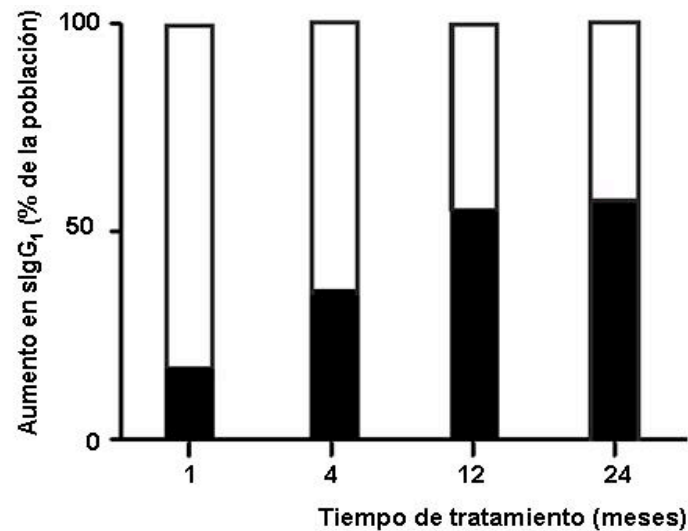


Figura 12. Porcentaje de pacientes que mostraron un aumento significativo en las cifras de sIgG₁ (frente a Phl p 1 + Phl p 5) a lo largo de los 2 años de tratamiento.

La cifra de sIgG1 al final del ensayo clínico seguía por encima del nivel anterior a comenzar la IT en el 46% de los pacientes (Figura 13).

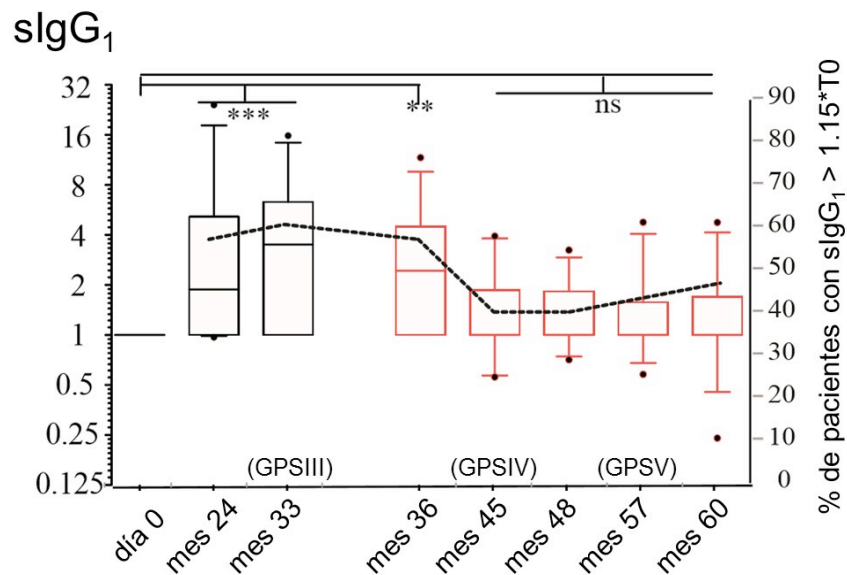


Figura 13. Modulación de la respuesta sIgG₁ (frente a Phl p 1 + Phl p 5) a lo largo de los 5 años del estudio. Los niveles de sIgG₁ se expresan como el n° de veces que cambian con respecto a los basales, mientras que la línea de puntos indica el porcentaje de la población que muestra niveles de sIgG₁ menores que en T0. Las barras muestran la media ± 95% del intervalo de confianza. GPSIII, tercera estación polínica; GPSIV, cuarta estación polínica; GPSV, quinta estación polínica. ** p < 0.01, *** p < 0.001, ns no significativa.

El análisis de los niveles de sIgE y sIgG₄ séricas frente a los alérgenos Phl p 1 + Phl p 5 de *Phleum* mostró una correlación significativa entre los aumentos en la sIgE al mes 1 y la sIgG₄ al mes 4 del tratamiento (Figura 14), pero no con los aumentos en la sIgG₁ en ningún momento del tratamiento (datos no mostrados). No se observó asociación entre los valores basales de la sIgE y los cambios en los niveles de sIgG₄ o sIgG₁ durante el tratamiento (Figura 15).

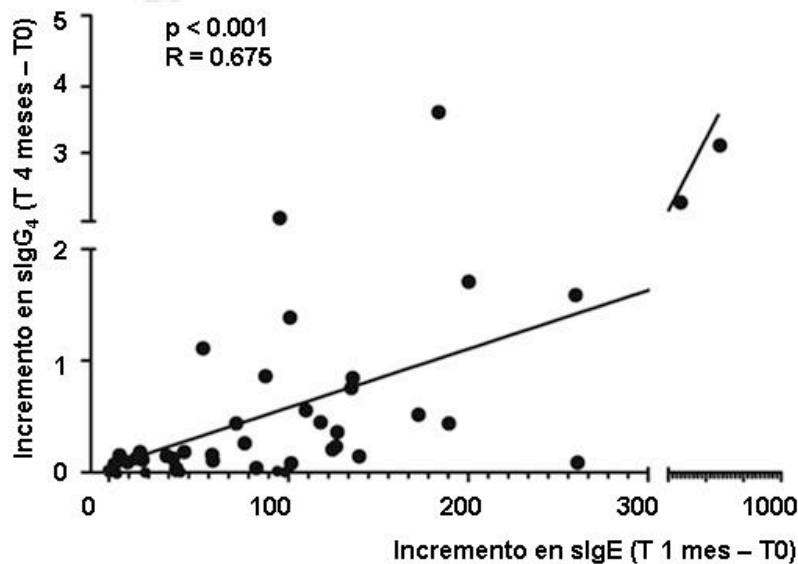


Figura 14. Correlación entre el aumento en los niveles de sIgE (Phl p 1 + Phl p 5), desde el tiempo basal al mes 1, y el aumento en la sIgG₄ (Phl p 1 + Phl p 5) expresado como el n° de veces que cambia al mes 4 con respecto al basal. R, coeficiente de correlación de Pearson.

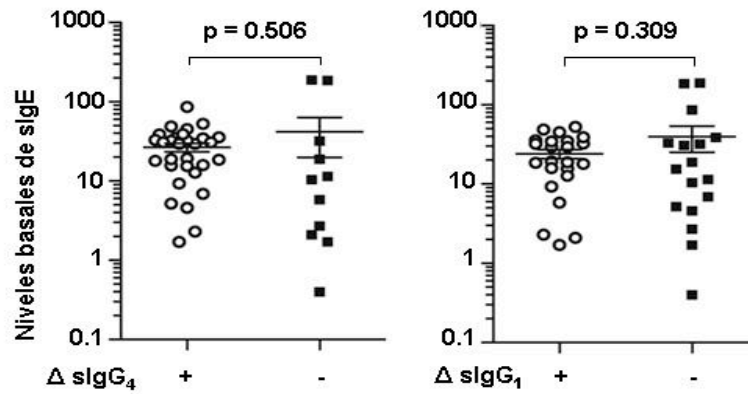


Figura 15. Valores basales de sIgE de los pacientes con (círculos abiertos) o sin (cuadrados) un aumento en las cifras de sIgG₄ (gráfica izquierda) o sIgG₁ (gráfica derecha) durante el tratamiento. Se utilizó la prueba t de Student no pareada con la corrección de Welch.

El cociente entre sIgE/sIgG₄ al final del estudio en el 70% de los pacientes fue menor que antes de la SLIT (Figura 16).

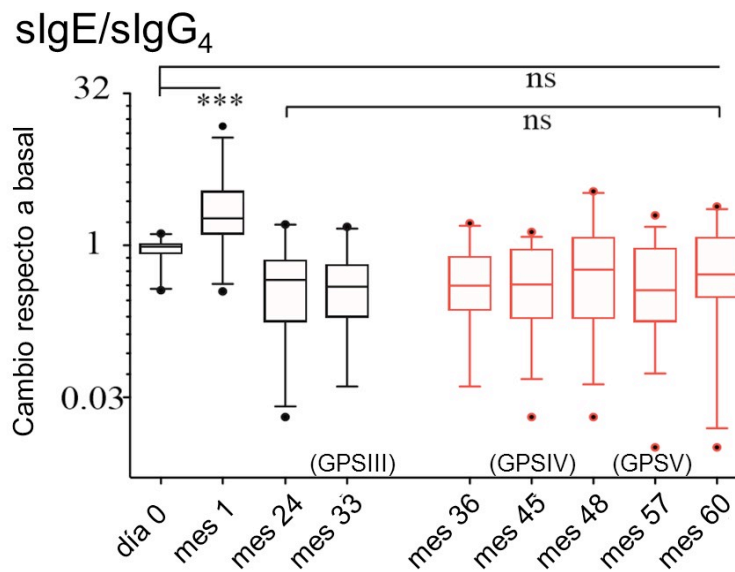


Figura 16. Cociente de sIgE/sIgG₄ (frente a Phl p 1 + Phl p 5) respecto a la basal a lo largo de los 5 años del estudio. El cociente de sIgE/sIgG₄ se expresa como el n° de veces que cambia con respecto al basal. Las barras muestran la media ± 95% del intervalo de confianza. GPSIII, tercera estación polínica; GPSIV, cuarta estación polínica; GPSV, quinta estación polínica. *** p < 0.001, ns no significativa.

2.2 Perfil de citocinas de tipo Th2

Para determinar si la SLIT induce una modulación en la producción de citocinas en sangre periférica, se estudió la frecuencia de células productoras de citocinas en las subpoblaciones de PBMC. Las PBMC de los pacientes mostraron una respuesta bifásica en la frecuencia de células IL-4⁺, con un aumento precoz en el mes 1 en el 90% de los pacientes (Figura 17), seguido de una reducción progresiva a partir del mes 4 en el 54% de estos pacientes. Durante la GPSI, el 90% de los pacientes mostró una reducción en la frecuencia de células IL-4⁺. Los niveles basales se restablecieron en el 68% al primer año, mientras que la frecuencia de células IL-4⁺ se mantuvo superior a la basal en el restante 32%. Durante el segundo año de tratamiento, la frecuencia de células IL-4⁺ fue similar o inferior a la basal en el 95% de los pacientes, tanto en la estación polínica como fuera de ella. Aunque la contribución precisa de cada tipo celular depende del paciente, entre los linfocitos T CD3⁺ y los NK CD56^{dim}CD16⁺ dan cuenta del 50-60% de las células IL-4⁺ detectadas basalmente (datos no mostrados).

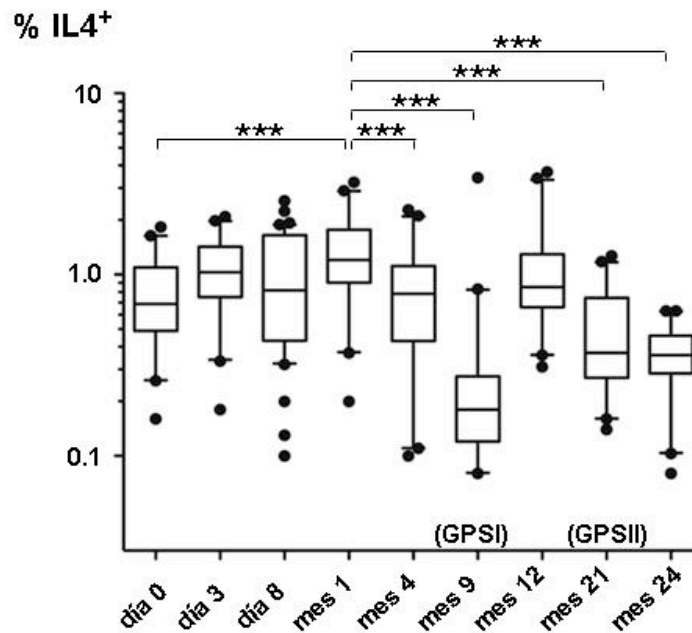


Figura 17. Proporción de células IL4⁺ entre las PBMC de los pacientes (n=40) durante el tratamiento con SLIT. Los datos se muestran como la media \pm 90% del intervalo de confianza. GPSI, primera estación polínica; GPSII, segunda estación polínica. *** p < 0.001.

Al finalizar los 3 años de tratamiento, la proporción de células IL-4⁺ fue menor que al inicio del estudio en el 89% de los pacientes, sin observarse incremento estacional en la GPSIII. Esta reducción se mantenía en el cuarto y quinto año en el 80% los pacientes, lo que indica que la inhibición de la respuesta Th2 se mantiene no solo durante el tratamiento sino también en los 2 años posteriores. Detectamos un descenso en la proporción de células IL-4⁺ durante las estaciones polínicas tras interrumpir el tratamiento, que fue más pronunciado en la GPSIV, aunque no alcanzó significación estadística al compararlo con las visitas de finalización del tratamiento (T12) (Figura 18).

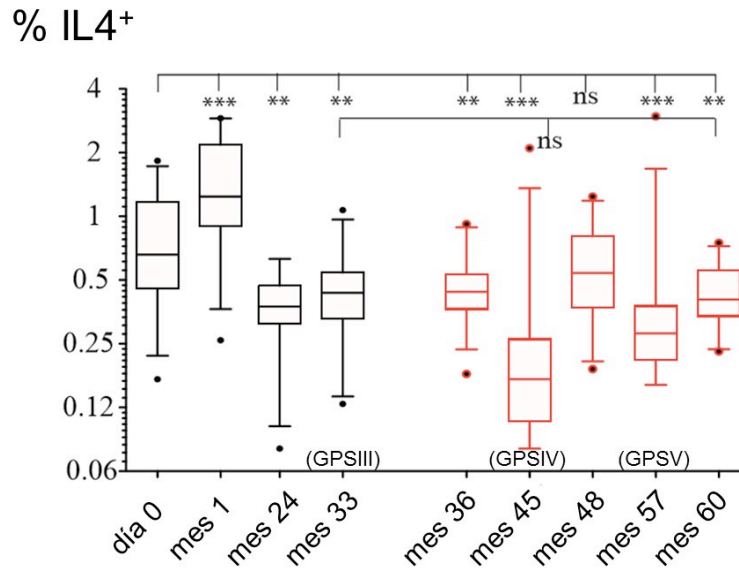


Figura 18. Proporción de células IL4⁺ entre las PBMC de los pacientes al final del estudio (n=30). Los datos se muestran como la media \pm 90% del intervalo de confianza. GPSIII, tercera estación polínica; GPSIV, cuarta estación polínica; GPSV, quinta estación polínica. ** p < 0.01, *** p < 0.001, ns no significativa.

La proporción de células linfoides IL-5⁺ (principalmente linfocitos T CD3⁺) alcanzó un máximo en la GPSI; tres meses después, la frecuencia de células IL-5⁺ se redujo, al compararlo con la GPSI, pero siguió siendo superior a la basal (Fig. 10). Durante el segundo año de tratamiento, no se observó aumento en la frecuencia de estas células ni durante la GPSII ni fuera de ella, más aún, durante este periodo se registró la menor proporción de células IL-5⁺ (Fig. 10). Estos hallazgos sugieren que la SLIT suprime la respuesta de citocinas de tipo Th2.

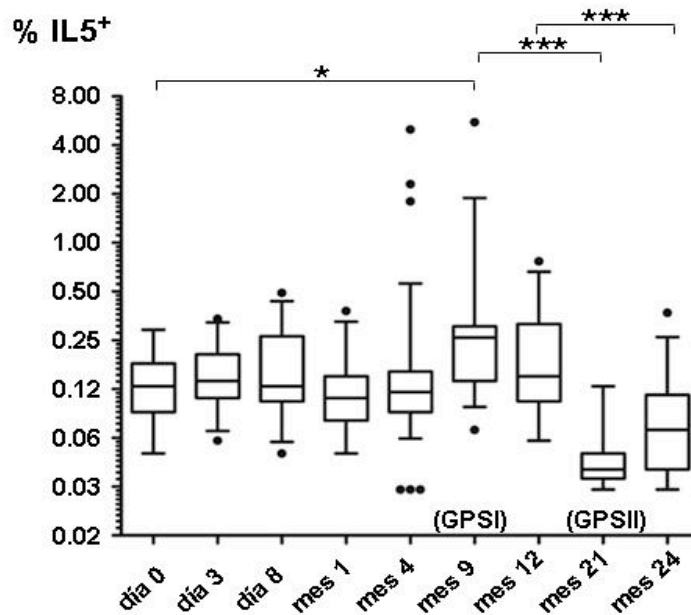


Figura 19. Proporción de células IL5⁺ entre las PBMC de los pacientes (n=40) durante el tratamiento con SLIT. Los datos se muestran como la media \pm 90% del intervalo de confianza. GPSI, primera estación polínica; GPSII, segunda estación polínica. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Tanto la proporción de células IL-4⁺ como los niveles de sIgE sérica mostraron un incremento inicial transitorio, que se siguió de una reducción progresiva durante el tratamiento. La comparación de las cinéticas de respuesta mostró una coincidencia temporal para ambos parámetros en la mayoría de los pacientes, con inducción al mes y subsecuente regulación a la baja (Figura 20). De este modo, en la sangre periférica del 82.6% de los pacientes, se encontró un aumento concomitante en la proporción de células IL4⁺ y en la producción de sIgE, tan pronto como al primer mes de iniciar la SLIT, lo que sugiere una respuesta aumentada tipo Th2 en las PBMC en el mes 1 del tratamiento. La regulación a la baja de esta respuesta fue evidente al mes 4 en el 48% de los pacientes, mientras que el 11% no mostró reducción en ninguno de estos dos parámetros, lo que totaliza una coincidencia del 59% en la respuesta de los pacientes para estos 2 factores tras 4 meses de tratamiento. Tras 2 años de

tratamiento, el 84% de los pacientes mostró una reducción persistente en ambos parámetros.

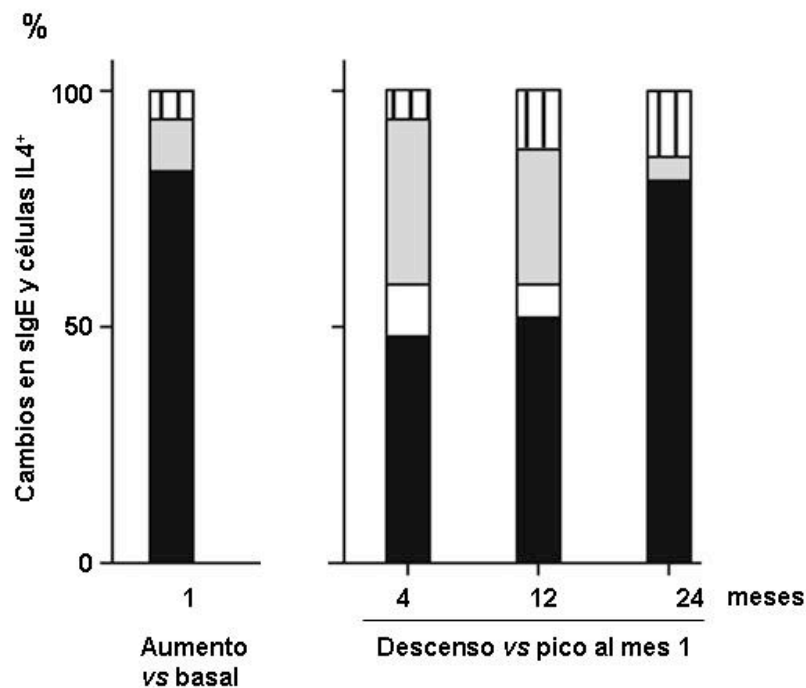


Figura 20. Perfil temporal que muestra el porcentaje de pacientes con aumento en los niveles de sIgE y en la proporción de células IL4+ desde el basal al pico del primer mes, así como el descenso en estos parámetros desde el pico mensual a los meses 4, 12 y 24. Se muestran los pacientes con cambios en los niveles de sIgE y células IL4+ (barras negras), o sin cambios (barras blancas), así como los pacientes con cambios sólo en la sIgE (barras discontinuas) o en sólo en la proporción de células IL4+ (barras grises).

Se utilizó el aumento en el recuento de eosinófilos en sangre periférica durante la GPS como indicador de la respuesta alérgica del paciente al polen ambiental. En aproximadamente el 80% de los pacientes, el pico significativo en el recuento de eosinófilos en la GPSI se redujo 3 meses después. En los pacientes restantes, el pico de eosinófilos no se correspondió con el periodo de la GPSI o bien no se detectó reducción en los eosinófilos. En el 65% de los pacientes, los eosinófilos disminuyeron en la GPSII con respecto a la GPSI (Figura 21), lo que sugiere desensibilización al alérgeno en el segundo año de tratamiento.

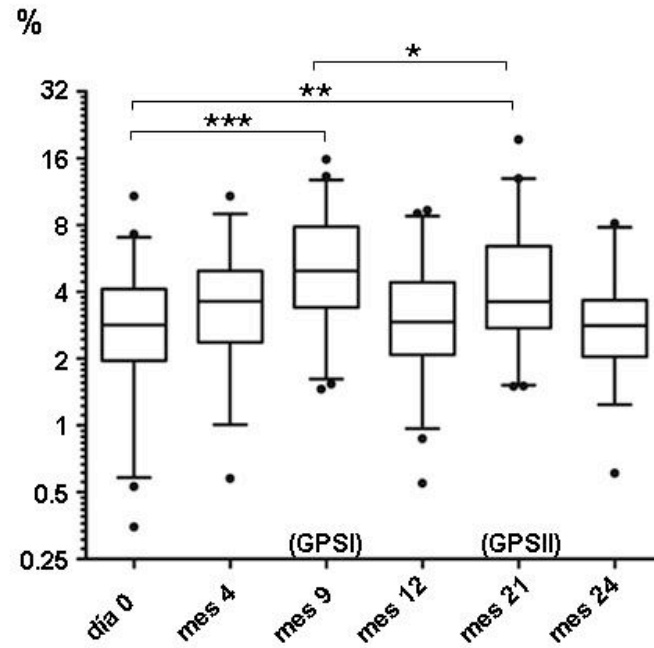


Figura 21. Porcentaje de eosinófilos en sangre periférica de los pacientes (n=40, se representa la media \pm 95% del intervalo de confianza) a lo largo de los 2 años de tratamiento. GPSI, primera estación polínica; GPSII, segunda estación polínica. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Se detectó una reducción significativa en la eosinofilia en la GPSIII al compararla con la GPSI, sin aumento estacional, reducción que se mantuvo tras finalizar el tratamiento, en las GPSIV y V (Figura 22).

% Eosinófilos

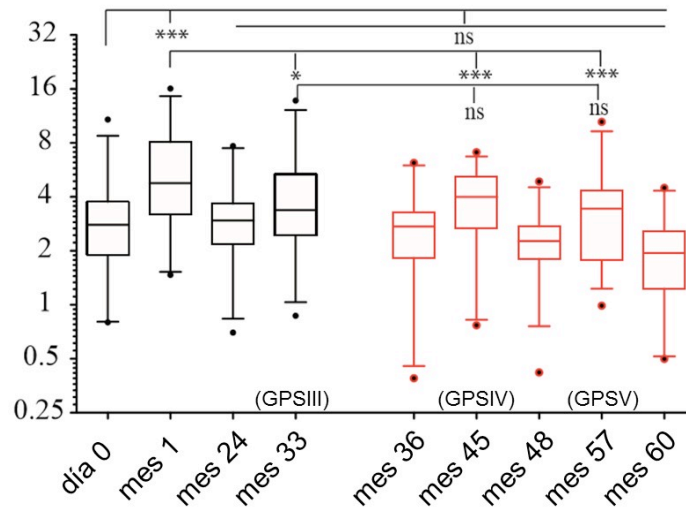


Figura 22. Porcentaje de eosinófilos en sangre periférica de los pacientes (n=30, se representa la media \pm 95% del intervalo de confianza) a lo largo de los 5 años de tratamiento. Los datos se muestran como la media \pm 90% del intervalo de confianza. GPSIII, tercera estación polínica; GPSIV, cuarta estación polínica; GPSV quinta estación polínica. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ns no significativa.

2.3 Correlación entre los cambios en la inmunidad humoral y celular

El aumento en la respuesta de tipo Th2, seguido por su reducción progresiva, junto con el aumento en los niveles de anticuerpos específicos distintos de la sIgE en los pacientes sometidos a tratamiento, nos llevó a considerar un papel modulador del complejo sIgE-alérgeno a través de su unión a los linfocitos B. Se utilizó el ensayo *in vitro* de unión al alérgeno facilitada por IgE (IgE-FAB), para determinar si el suero de los pacientes inhibía la unión IgE-alérgeno a los linfocitos B.

La unión de complejos alérgeno-sIgE disminuyó progresivamente cuando los linfocitos B se incubaron con suero de pacientes tratados durante 4 o más meses (Figura 23). Por lo tanto, la capacidad del suero de los pacientes para

inhibir la unión de IgE a los linfocitos B parece aumentar con el tiempo de tratamiento.

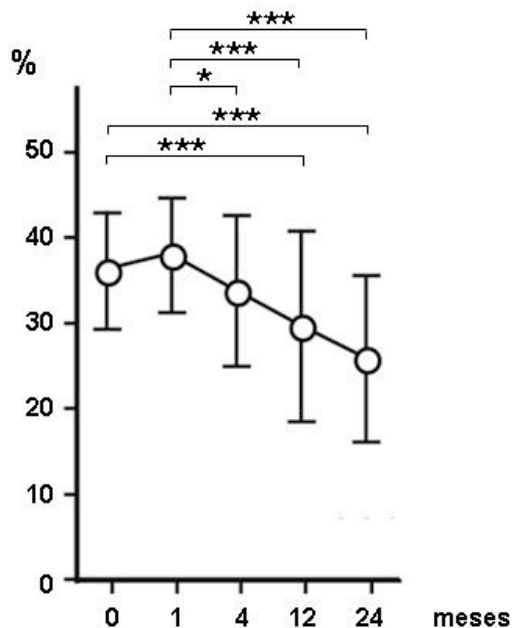


Figura 23. Porcentaje de linfocitos B con unión a complejos de sIgE-alérgeno, mostrado como la media \pm SD a lo largo de los 2 años de tratamiento. La SLIT induce un aumento en el efecto bloqueante del suero de los pacientes sobre la unión de los complejos IgE-alérgeno a los linfocitos B. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Para estudiar la posible asociación entre los niveles de sIgE, la proporción de células IL4⁺ y el bloqueo de la unión sIgE-alérgeno a los linfocitos B en el suero de los pacientes, se evaluó estas variables usando el coeficiente de correlación de Pearson. La comparación del n° de veces que cambia respecto a la basal la inhibición de la unión sIgE-alérgeno a los linfocitos B se correlacionó significativamente con el descenso en los niveles de sIgE (Figura 24) y en la proporción de células IL-4⁺ (Figura 25), desde el pico al mes 1 hasta los 4 meses de tratamiento.

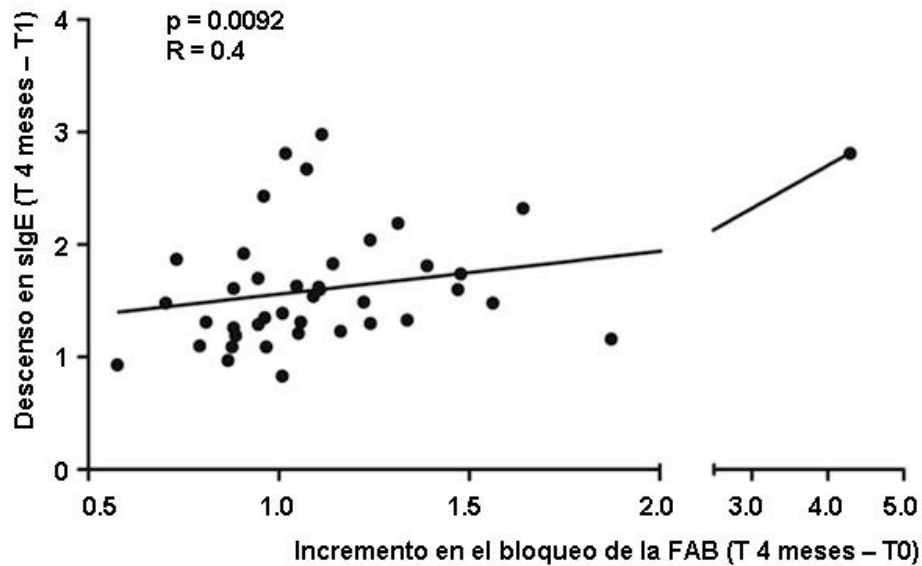


Figura 24. La reducción en los niveles de sIgE desde el mes 1 al mes 4 de tratamiento, se asoció significativamente con el aumento a los 4 meses de la inhibición de la unión de los complejos sIgE-alérgeno a los linfocitos B. Ambos valores se expresan como el número de veces que cambian respecto a los valores iniciales. FAB, unión al alérgeno facilitada por IgE; R, coeficiente de correlación de Pearson.

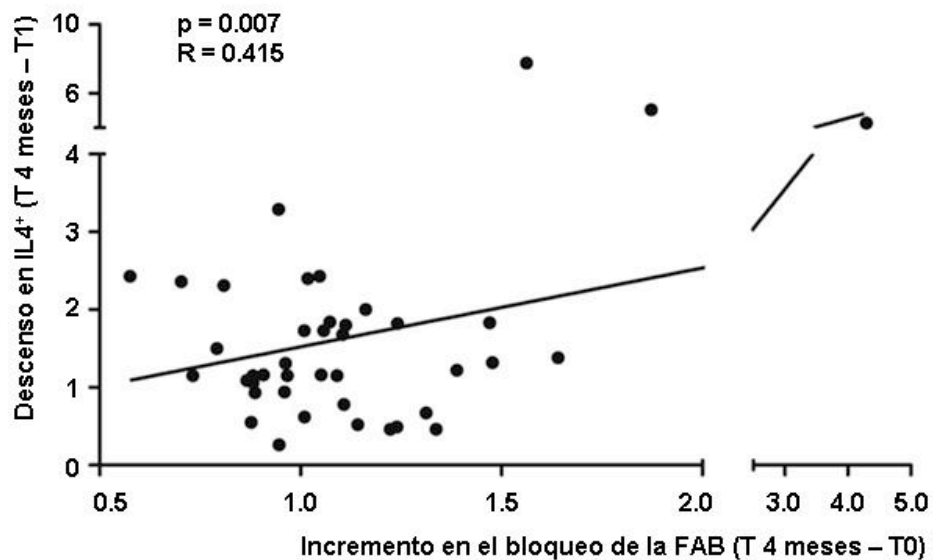


Figura 25. La reducción en la proporción de células IL4⁺ desde el mes 1 al mes 4 de tratamiento, se asoció significativamente con el aumento a los 4 meses de la inhibición de la unión de los complejos sIgE-alérgeno a los linfocitos B. Ambos valores se expresan como el número de veces que cambian respecto a los valores iniciales. FAB, unión al alérgeno facilitada por IgE; R, coeficiente de correlación de Pearson.

El efecto bloqueante podría ser causado por una inmunoglobulina específica inducida por el tratamiento distinta de la sIgE; para estudiar estas relaciones,

se comparó los cambios en los niveles de slgG_4 e slgG_1 , con los niveles de slgE y la proporción de células IL-4^+ . El aumento en los niveles de slgG_4 desde el inicio hasta el mes 4 de tratamiento, se correlacionó con el descenso en la slgE desde el mes 1 hasta todos los tiempos de tratamiento considerados (Figura 26). El aumento en los niveles de slgG_4 desde el inicio al mes 1, también se correlacionó con el descenso posterior en los niveles de slgE (datos no mostrados); si bien la correlación no alcanzó significación estadística durante el segundo año de tratamiento.

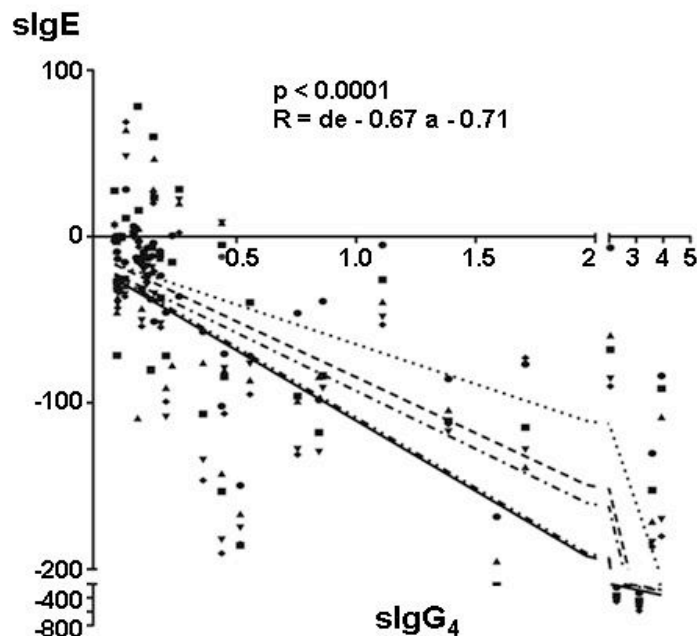


Figura 26. El descenso en los niveles de slgE desde el mes 1 al mes 4 (círculos), al mes 9 (cuadrados), al mes 12 (triángulos) y al mes 24 (rombos) se correlaciona con el aumento en los niveles de slgG_4 al mes 4 respecto al basal.

Se encontró una correlación inversa en el suero de los pacientes tratados, entre el aumento en los niveles de slgG_4 y el porcentaje de linfocitos B unidos a complejos slgE -alérgeno al mes 4 (datos no mostrados) y 12 de tratamiento (Figura 27).

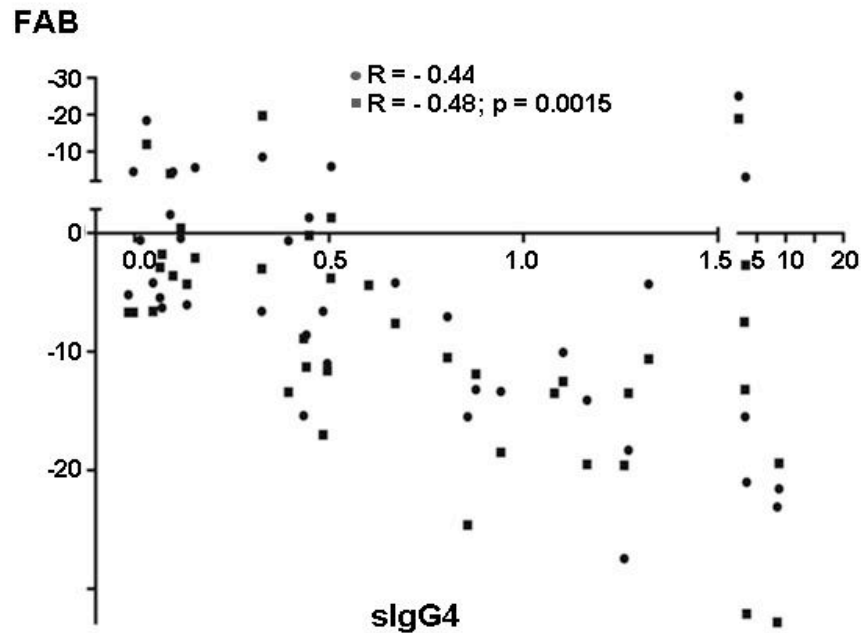


Figura 27. El descenso en la unión a los linfocitos B de los complejos sIgE-alérgeno a los 12 meses de tratamiento, con respecto a la situación basal (círculos) o al mes 1 (cuadrados), se correlacionó con el aumento en los niveles de sIgG₄ al mes 12 respecto al basal.

La reducción en la proporción de células IL-4⁺ al mes 4 se restringió a los pacientes con aumento en los niveles de sIgG₄ en los meses 1 y 4 de tratamiento (Figura 28, izquierda). No hubo diferencias significativas en el aumento de células IL4⁺ al mes 1 de tratamiento entre los pacientes que mostraron aumento en la sIgG₄ al mes 1 y los que no lo hicieron (Figura 28, derecha). No se observó asociación entre los cambios en los niveles de sIgG₁ y sIgE.

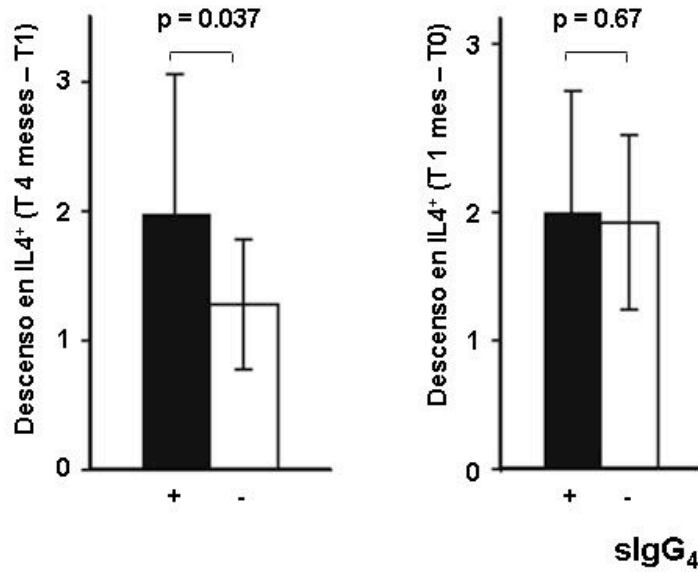


Figura 28. La reducción en la proporción de las células IL4⁺ al mes 4 con respecto al mes 1 de tratamiento (izquierda), es significativamente superior en los pacientes que muestran un aumento en los niveles de IgG₄ al mes 1 (+), al compararlo con los pacientes que no muestran dicho aumento (-), mientras que no se encuentran diferencias en la proporción de las células IL4⁺ al mes 1 de tratamiento entre ambos grupos de pacientes (derecha).

A los 5 años, en el 83% de los pacientes la unión IgE-alergeno a los linfocitos B permanecía por debajo de la observada antes de la SLIT, si bien al final del seguimiento de los pacientes hubo cierto aumento respecto a los niveles observados al finalizar el tercer año de tratamiento (Figura 29).

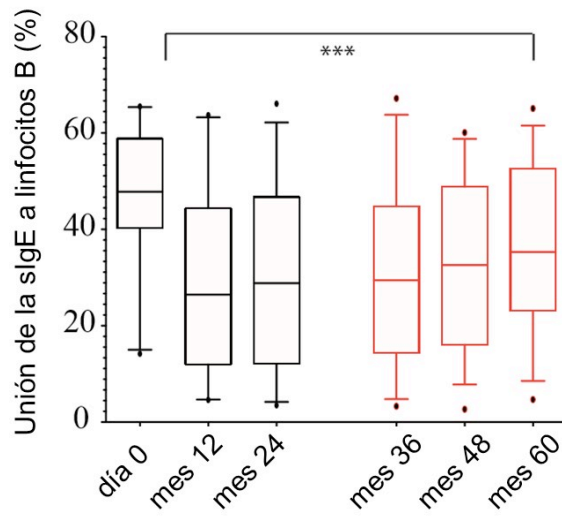


Figura 29. Porcentaje de linfocitos B con unión a complejos de sIgE-alérgeno. Se representa la media \pm 95% del intervalo de confianza a lo largo de los 5 años del estudio. La SLIT induce un aumento en el efecto bloqueante del suero de los pacientes sobre la unión de los complejos IgE-alérgeno a los linfocitos B. *** $p < 0.001$.

Se encontró una correlación inversa entre el aumento en la sIgG4 y el cambio con respecto al nivel basal en la unión IgE-alérgeno específica a los linfocitos B, tanto al finalizar el tercer año de tratamiento, como en los 2 años de seguimiento posterior (Figura 30).

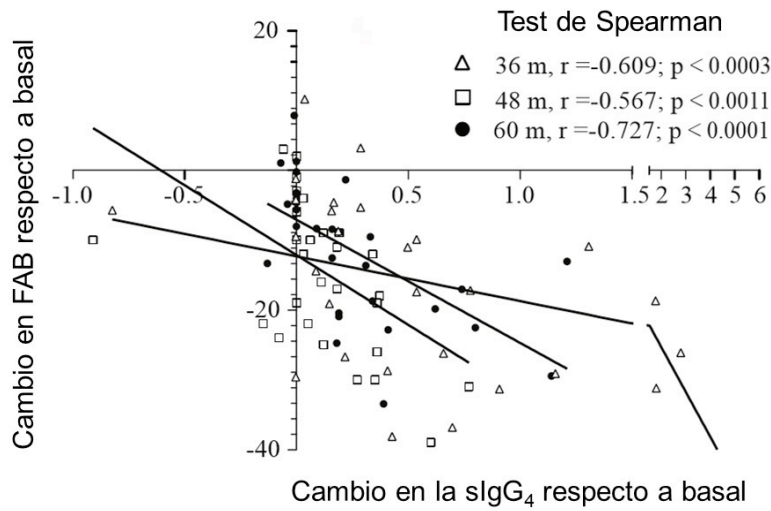


Figura 30. El descenso en el porcentaje de linfocitos B con unión a complejos de sIgE-alérgeno se correlaciona con el aumento en los niveles de sIgG₄ con respecto a la situación basal, en los meses 36 (△), 48 (□) y 60 (●).

2.4 Correlación entre los cambios serológicos y la respuesta clínica

Por medio de las escalas de mejoría subjetiva de la rinitis respecto a la primavera del año anterior, se demostró una correlación positiva entre la puntuación de mejoría clínica acumulada en los 2 años de tratamiento y el descenso en los niveles de sIgE en todos los tiempos posteriores, al compararlos con los niveles de sIgE en el mes 1 (Figura 31).

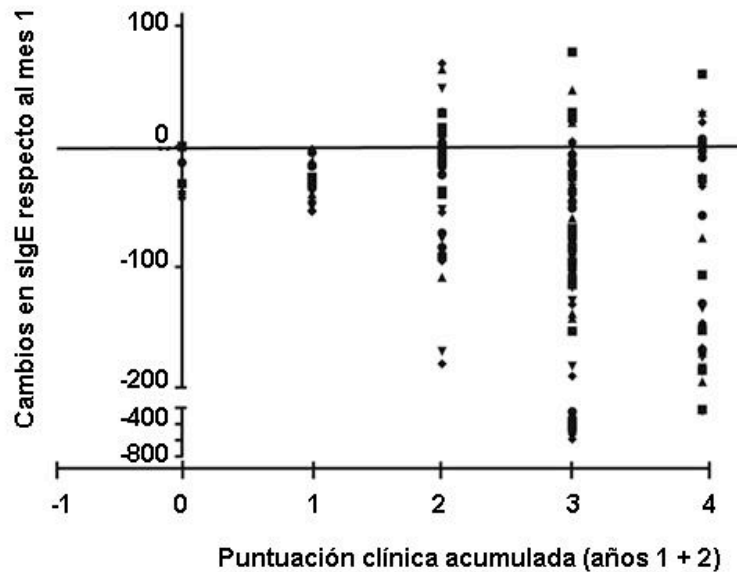


Figura 31. Correlación entre los cambios en los niveles de sIgE con la mejoría clínica en pacientes tratados con SLIT en tabletas de gramíneas. La puntuación clínica acumulada al final del tratamiento se correlacionó con el descenso en los niveles de sIgE entre el mes 1 y el mes 4 (círculos), el mes 12 (cuadrados), el mes 21 (triángulos) y el mes 24 (rombos). El coeficiente de correlación de Spearman varió entre $r = 0.4466$ al mes 4 ($p = 0.0049$), $r = 0.3551$ al mes 12 y $r = 0.3405$ al mes 24 (con valores para 2 colas de p desde 0.029 a 0.039).

Del mismo modo, el aumento en los niveles de sIgG₄ desde los basales hasta los meses 1 y 4 de tratamiento, se correlacionó de forma significativa con la mejoría clínica subjetiva experimentada por los pacientes (Figura 32). También se detectó una correlación positiva entre las puntuaciones clínicas acumuladas a los 2 años de tratamiento y el aumento en los niveles de sIgG₄ al mes 12 (Spearman $r = 0.3022$, $p = 0.065$) o al mes 24 (Spearman $r = 0.19$, $p = 0.22$), si bien no alcanzó significación estadística.

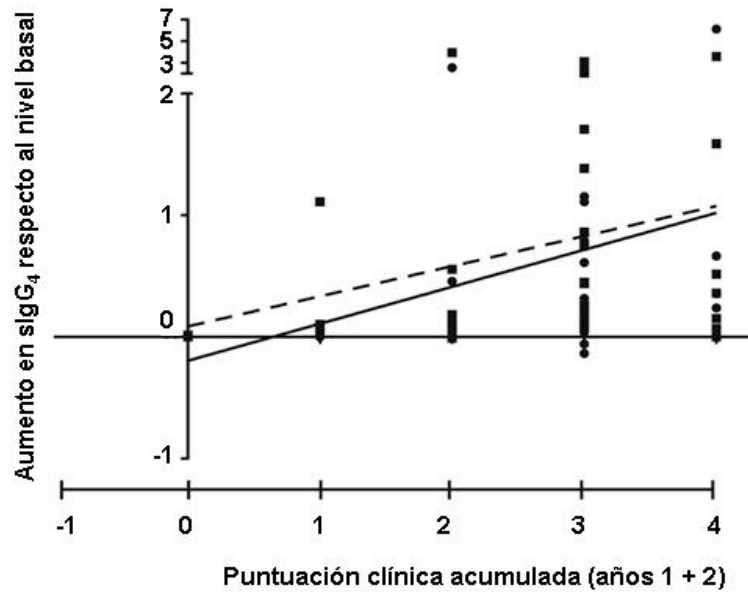


Figura 32. Correlación entre los cambios en los niveles de sIgG₄ con la mejoría clínica en pacientes tratados con SLIT en tabletas de gramíneas. La puntuación clínica acumulada al final del tratamiento se correlacionó con el aumento en los niveles de sIgG₄ desde el basal al mes 1 (círculos, coeficiente de correlación de Spearman $r = 0.3684$, $p = 0.022$) y al mes 4 (cuadrados, Spearman $r = 0.423$, $p = 0.008$).

La evaluación subjetiva por parte de los pacientes de su situación clínica, asignando una puntuación mediante una escala tipo Likert en cada estación polínica respecto a la anterior, fue utilizada para construir un índice acumulativo al finalizar los 3 años de tratamiento y otro índice correspondiente a los 2 años de seguimiento, de aquellos pacientes que completaron el estudio (Tabla 6). Se analizó la relación entre estos índices y los parámetros inmunológicos por medio de la prueba exacta de Fisher. El 40.7% de los pacientes mostraron tanto una mejoría clínica mantenida al finalizar el estudio (índice tras tratamiento >1 e índice tras seguimiento ≥ 0), así como un descenso mantenido de los niveles de sIgE a los 5 años (sIgE al final del estudio inferior a los niveles en la estación polínica previa a finalizar el tratamiento). El 30% no mostraron ninguna de las anteriores condiciones. El restante 30% mostró sólo una de las condiciones detalladas, la mejoría mantenida de los síntomas al final del estudio el 26% o el descenso en los niveles de sIgE a los 5 años el 4%. Se

demostró una asociación significativa entre la puntuación clínica y los cambios en los niveles de sIgE al quinto año ($p=0.0192$) (Figura 33).

Tabla 6. Relación entre la mejoría clínica y los cambios inmunológicos.

Nº	Año					IC 3	IC 5	Razón sIgE 5/4	Razón sIgE 5/3
	1	2	3	4	5				
04	1	2	2	0	1	5	1	1,13	3,94
05	1	2	2	0	-1	5	-1	1,29	0,75
07	1	1	1	2	0	3	2	0,75	0,36
08	2	2	-1	1	1	3	2	0,18	0,05
11	2	2	1		1	5		0,87	0,37
13	2	2	-1	2	-1	3	1	0,79	0,95
14	2	2	2	-1	1	6	0	1,09	0,56
15	2	0	1	1	1	3	2	1,66	0,80
16	2	1	0	-1	1	3	0	0,76	0,56
19	1	-1	1	0	1	1	1	3,99	1,48
20	2	2	1	2	-1	5	1	1,14	0,32
21	1	1	1	-1	1	3	0	1,02	1,71
22	1	-1	0	1	0	0	1	1,51	1,73
23	0	1	2	0	0	3	0	0,83	0,60
25	2	1	1	1	1	4	2	1,02	0,34
28	1	1	2	-1	-1	4	-2	1,29	0,52
31	1	1	1	0	-1	3	-1	1,03	1,03
32	2	2	-1	2	-1	3	1	1,84	0,67
33	1	2	1	1	1	4	2	1,80	0,78
35	2	1	0	2	1	3	3	1,49	1,11
39	2	1	2	1	-1	5	0	0,96	0,61
41	1	1	2	0	-1	4	-1	0,83	1,57
42	1	2		-2	-1		-3	1,56	2,94
48	1	1	0	0	-1	2	-1	1,34	0,73
51	1	1	0	-1	-1	2	-2	1,47	0,78
52	2	1	0	2	0	3	2	1,09	0,39
54	1	1	0	1	1	2	2	2,24	0,83
55	1	1	1	1	1	3	2	1,00	0,99
57	1	2	2	-1	0	5	-1	1,16	0,79
59	1	1		0	2		2	0,64	0,18

Nº, número de paciente; IC 3, índice clínico al tercer año; IC 5, índice clínico al quinto año; Razón sIgE 5/4, cociente entre la sIgE al quinto y cuarto año; Razón sIgE 5/3, cociente entre la sIgE al quinto y tercer año.

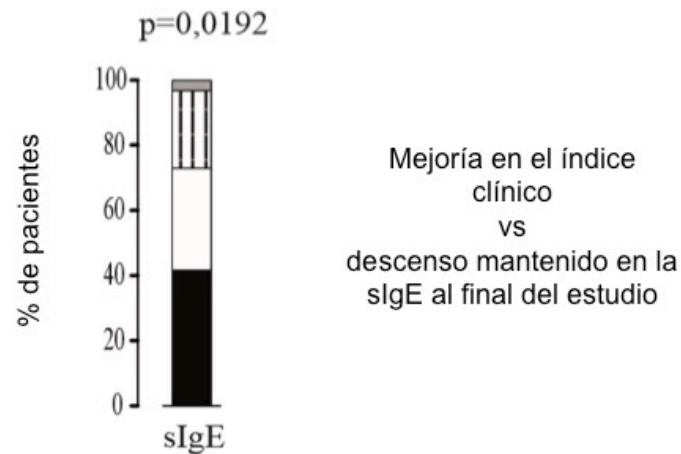


Figura 33. Porcentaje de pacientes que muestran: i) simultáneamente un descenso mantenido en la sIgE al final del estudio y mejoría en el índice clínico (barras negras), ii) ninguno de los dos (barras blancas), ó iii) únicamente una de las condiciones (descenso en la sIgE, barras grises; o aumento en Treg, barras discontinuas). Se aplicó el test de Fisher.

2.5 Aumento en la proporción de células productoras de IFN- γ

Con el fin de determinar si la reducción en la respuesta tipo Th2 se acompaña de un cambio a respuesta tipo Th1 durante el tratamiento, se estudió los cambios en la proporción de células productoras de IFN- γ . Dicha proporción de células IFN- γ^+ aumentó en PBMC en el 65% de los pacientes, alcanzando un pico al mes 12 (es decir, 3 meses después de la GPSI), que persiste durante el segundo año de tratamiento (Figura 34).

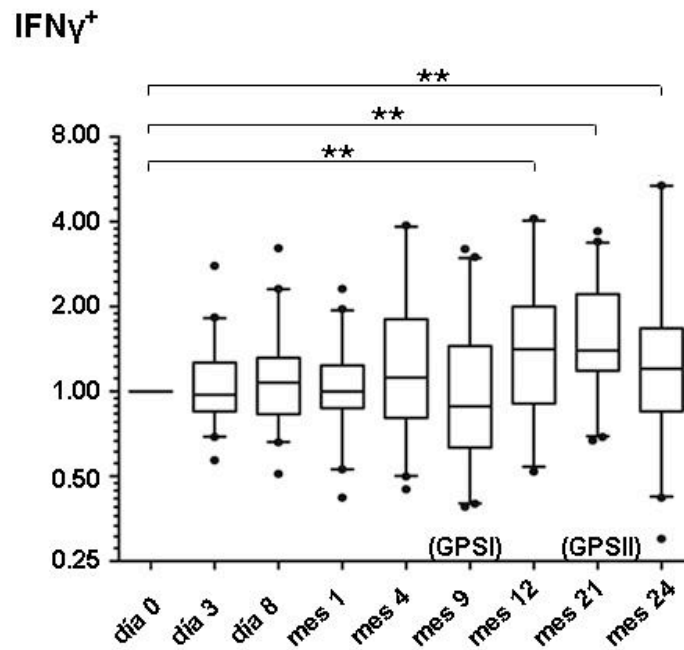


Figura 34. Proporción de células IFN- γ ⁺ a lo largo del tratamiento. Los datos se expresan como el n° de veces que cambian con respecto a los basales. Las barras muestran la media \pm 95% del intervalo de confianza. GPSI, primera estación polínica; GPSII, segunda estación polínica. ** p < 0.01

En el 50% de los pacientes, el aumento en la proporción de células IFN- γ ⁺ ya era significativo al mes 4, mientras que aproximadamente el 15% de los pacientes tardó 12 meses en mostrar un aumento significativo, que persistió a partir de entonces. Algunos pacientes (35%) no mostraron un aumento persistente en esta proporción de células (Figura 35).

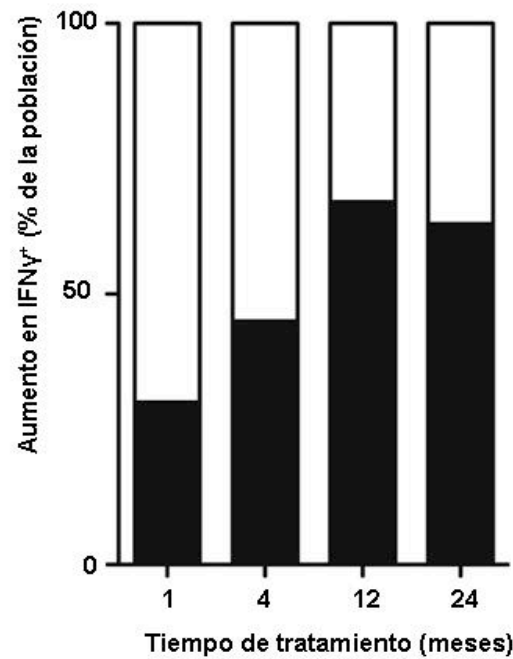


Figura 35. Porcentaje de pacientes que mostraron un aumento significativo en la proporción de células IFN- γ^+ a lo largo de los 2 años de tratamiento.

El análisis de la citometría de flujo indicó que aproximadamente el 60% de las células IFN- γ^+ son linfocitos NK CD56 $^+$ CD3 $^-$ de ambos subtipos (CD16 $^+$, del 26% al 30%; CD16 $^-$, el 70%), el 26% de los cuales son CD8 $^+$. Las células doblemente positivas a CD11c/CD11b también contribuyeron a aproximadamente el 20% del pool de células IFN- γ^+ . Tan solo alrededor del 10% de las células IFN- γ^+ son detectadas como linfocitos T CD3 $^+$ CD4 $^+$ o CD3 $^+$ CD8 $^+$ (Figura 36).

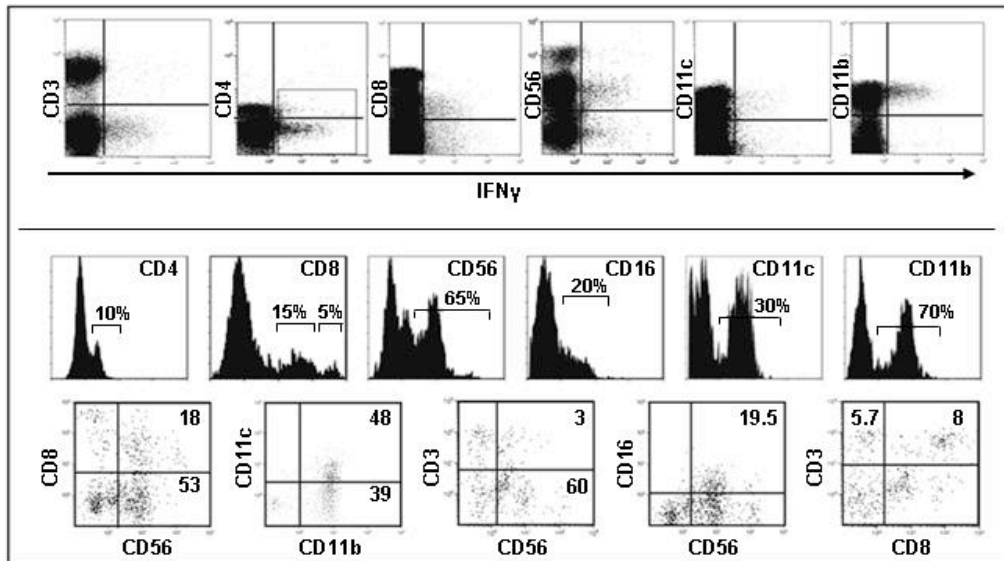


Figura 36. Resultados representativos de las citometrías de flujo y caracterización fenotípica de los tipos celulares de los pacientes tratados con SLIT. Los números dentro de las gráficas se refieren a los porcentajes de células en el área correspondiente.

La contribución precisa de cada tipo celular al pool de células IFN- γ ⁺ es específica del paciente. El aumento en la proporción de las células productoras de IFN- γ durante el tratamiento correspondió a células no CD4⁺. En cultivo (de hasta 5 días), el 85% de las células IFN- γ ⁺ fueron independientes de la estimulación con alérgeno, tanto a tiempo 0, como en los meses 9 (GPSI) y 12 de tratamiento (Figura 37). Nuestros datos indican que el aumento detectado en la proporción de células IFN- γ ⁺ no puede ser atribuido a la generación de una respuesta de tipo Th1 alérgeno específica.

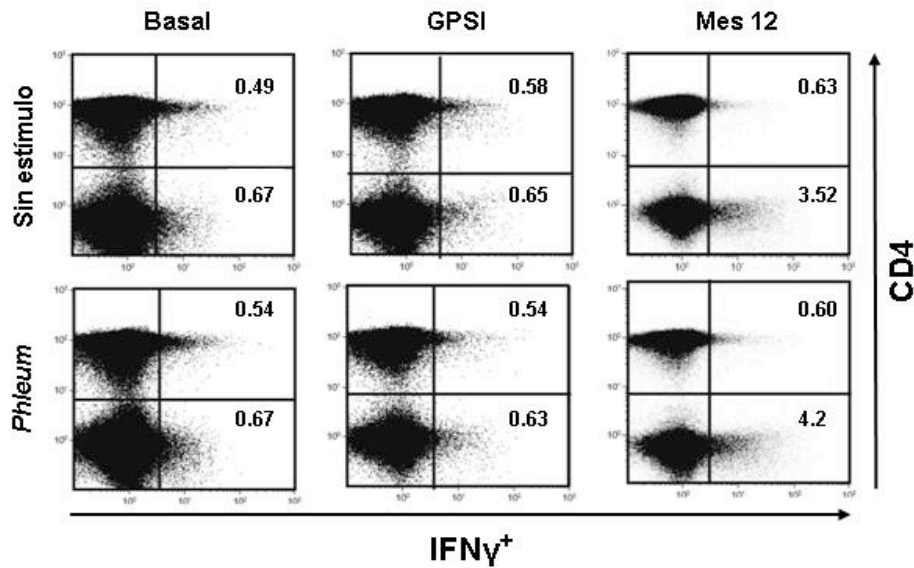


Figura 37. El aumento en la proporción de células IFN- γ^+ es independiente de la estimulación con alérgeno *in vitro*. Se muestran un resultado representativo de la citometría de las PBMC de un paciente, con o sin estímulo *in vitro* con extracto de gramíneas, en situación basal, durante la GPSI y al año de tratamiento.

2.6 Proporción de los linfocitos T CD4⁺ con fenotipo regulador

Puesto que la SLIT suprime las respuestas de tipo Th2 asociadas al polen de gramíneas (sIgE, sIgG₁, IL-4 e IL-5), en la mayoría de los pacientes al segundo año de estudio, nos cuestionamos si el tratamiento induce una respuesta reguladora mediada por linfocitos T. Se utilizó la citometría de flujo para fraccionar los linfocitos T CD4⁺ en base a las cadenas α de los receptores de superficie de las IL-7 e IL-2, así como de la expresión de CD45RA (Figura 38).

Para definir mejor los linfocitos de los pacientes con un fenotipo regulador (CD4⁺ CD127⁻ CD25⁺) (165,166), se utilizó como indicadores el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), el CD278 y la IL-10. En la población de linfocitos T memoria/inducidos, la subpoblación celular CD4⁺ CD127⁻ CD45RA⁻ CD25^{high} (linfocitos Treg memoria activados [amTreg]) mostró

los niveles mayores de CTLA4 y CD278, así como de producción de IL-10 (Figura 38).

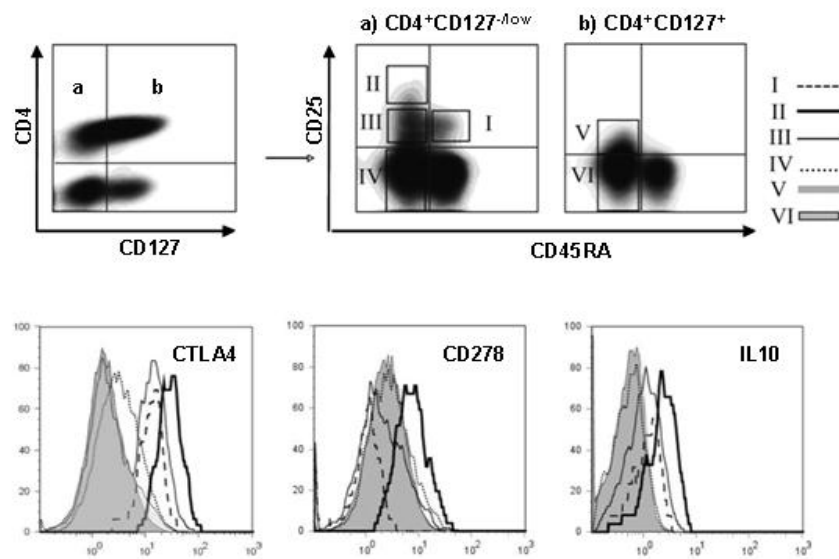


Figura 38. Fraccionamiento de los linfocitos T CD4⁺ y caracterización fenotípica de los subtipos celulares.

La capacidad para suprimir los linfocitos T convencionales está bien establecida para las fracciones CD4⁺ CD127⁻ CD45RA⁺ CD25^{high} (fracción I, linfocitos T no activados) y CD4⁺ CD127⁻ CD45RA⁻ CD25^{high} (fracción II, linfocitos amTreg). Las células de la fracción III tienen niveles intermedios de CTLA-4 y CD25 y un patrón CD278^{+/-} IL-10^{+/-}, aunque su capacidad supresora está por confirmar. El subtipo de linfocitos T CD4⁺ CD127⁺ CD45RA⁻ CD25⁺ (linfocitos T memoria) no cambió sustancialmente a lo largo del tratamiento (Figura 39) y los linfocitos T efectores (CD4⁺ CD127⁻ CD45RA⁻ CD25⁻) aumentaron únicamente durante la GPSI (Figura 40).

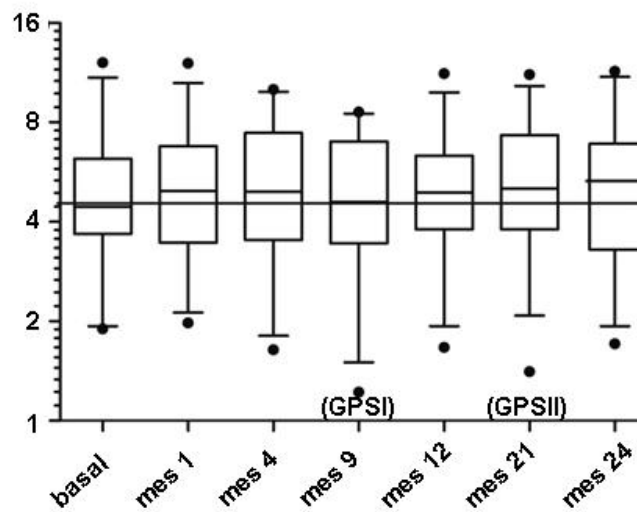
Linfocitos T CD127⁺ CD45RA⁻ CD25⁺ (V)

Figura 39. La proporción de linfocitos T memoria, caracterizados por los marcadores de superficie CD4⁺ CD127⁺ CD45RA⁻ CD25⁺, no mostró variación significativa a lo largo de los 2 años de tratamiento. Las barras muestran la media \pm 95% del intervalo de confianza. GPSI, primera estación polínica; GPSII, segunda estación polínica.

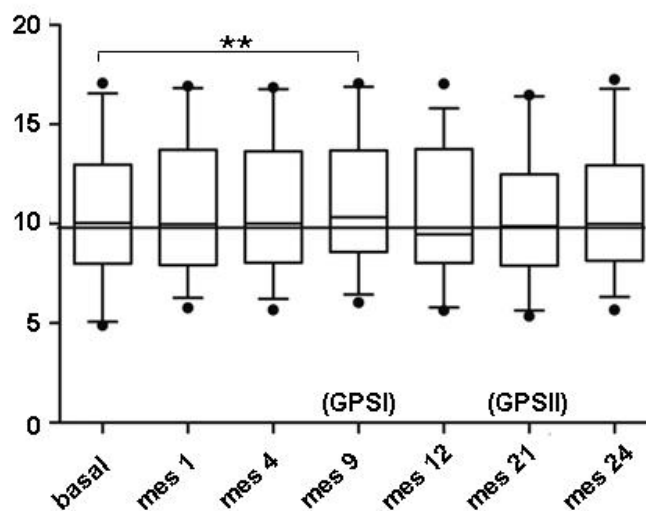
Linfocitos T CD127⁻ CD45RA⁻ CD25⁻ (IV)

Figura 40. La proporción de linfocitos T efectores, caracterizados por los marcadores de superficie CD4⁺ CD127⁻ CD45RA⁻ CD25⁻, aumentó únicamente durante la primera estación polínica. Las barras muestran la media \pm 95% del intervalo de confianza. GPSI, primera estación polínica; GPSII, segunda estación polínica. ** $p < 0.01$.

Por su parte, el tratamiento con SLIT indujo un incremento en el pool de linfocitos T reguladores, con fenotipo CD4⁺ CD127⁻ CD45RA⁻ CD25⁺

(fracciones II y III). Su proporción aumentó significativamente desde la GPSI hasta el final del tratamiento (Figura 41).

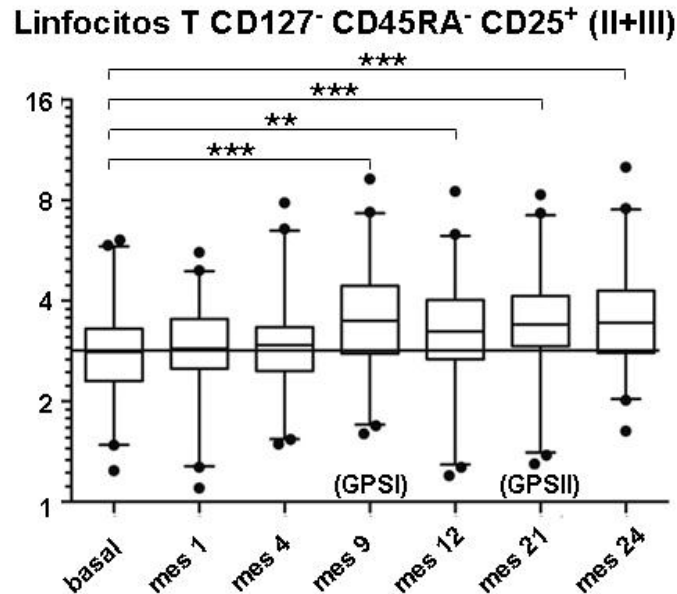


Figura 41. La proporción de linfocitos T reguladores, caracterizados por los marcadores de superficie CD4⁺ CD127⁻ CD45RA⁻ CD25⁺, aumentó significativamente desde la primera estación polínica hasta el final del seguimiento. Las barras muestran la media \pm 95% del intervalo de confianza. GPSI, primera estación polínica; GPSII, segunda estación polínica. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Se detectó estas células en el 36% de los pacientes al mes 4, cifra que aumentó al 44% al mes 12 y persistió durante el resto del tratamiento, mientras que el 29% de los pacientes sólo mostró aumento al segundo año y el 21% no mostró aumento en este subtipo celular (Figura 42).

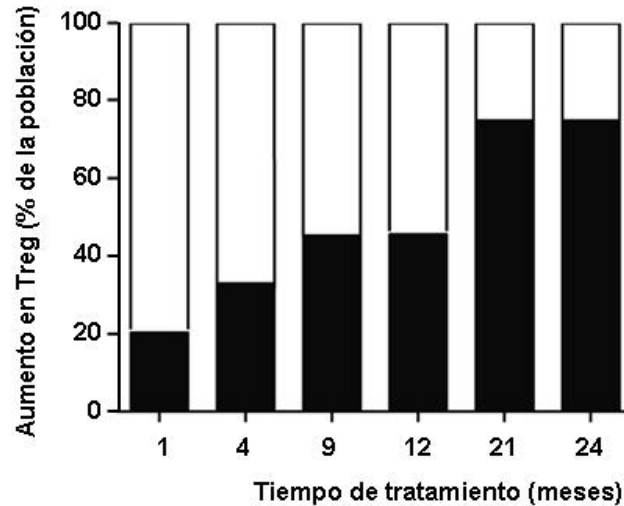


Figura 42. Porcentaje de pacientes que mostraron un aumento significativo en la proporción de linfocitos T reguladores, caracterizados por el fenotipo CD4⁺ CD127⁻ CD45RA⁻ CD25⁺, a lo largo de los 2 años de tratamiento.

El subtipo celular de linfocitos T reguladores con fenotipo CD4⁺ CD127⁻ CD45RA⁻ CD25^{high}, mostró un aumento significativo en su proporción durante el segundo año de tratamiento (Figura 43).

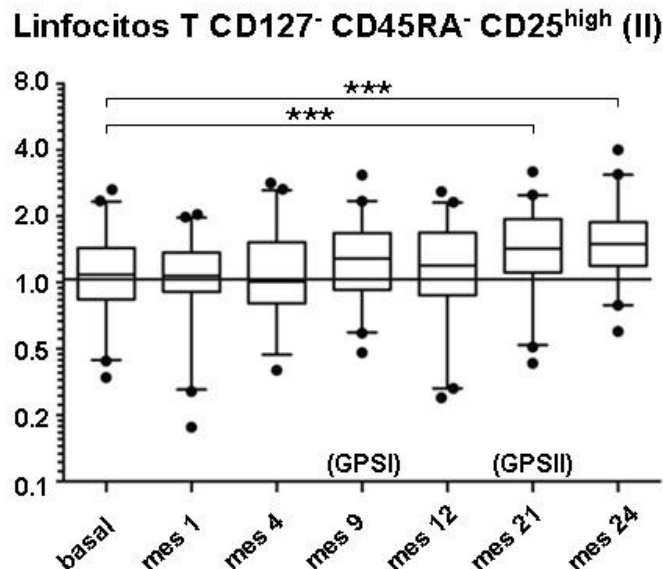


Figura 43. La proporción del subtipo de linfocitos T reguladores, caracterizados por los marcadores de superficie CD4⁺ CD127⁻ CD45RA⁻ CD25^{high}, aumentó significativamente durante el segundo año de tratamiento. Las barras muestran la media ± 95% del intervalo de confianza. GPSI, primera estación polínica; GPSII, segunda estación polínica. *** p < 0.001.

El porcentaje de linfocitos T reguladores no activados, $CD4^+ CD127^- CD45RA^+ CD25^+$, permaneció inalterado respecto al valor basal al final del tratamiento, aunque su proporción se redujo claramente durante la GPSI (Figura 44).

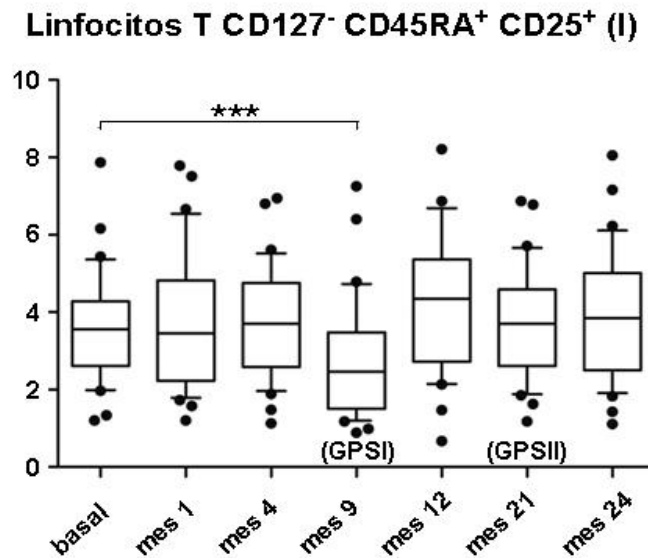


Figura 44. La proporción de linfocitos T reguladores no activados, caracterizados por los marcadores de superficie $CD4^+ CD127^- CD45RA^+ CD25^+$, disminuyó significativamente durante la primera estación polínica. Las barras muestran la media \pm 95% del intervalo de confianza. GPSI, primera estación polínica; GPSII, segunda estación polínica. *** $p < 0.001$.

De forma adicional la subpoblación celular con fenotipo Treg detectada en el 63% de los pacientes al finalizar el segundo año de tratamiento, persistió a lo largo del tercer año de terapia, así como en los dos años de seguimiento posteriores (Figura 45).

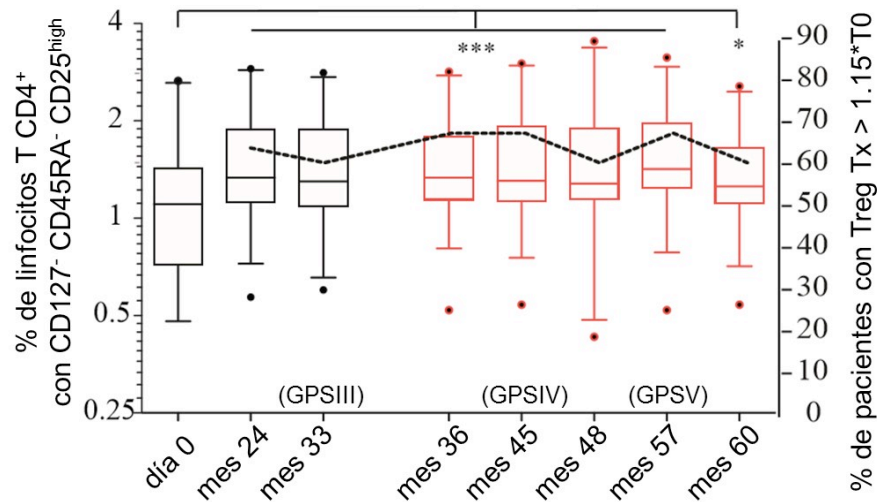


Figura 45. La proporción del subtipo de linfocitos T reguladores, caracterizados por los marcadores de superficie $CD4^+ CD127^- CD45RA^- CD25^{high}$, aumentó significativamente durante los tres años de tratamiento, persistiendo el aumento a lo largo de los 2 años de seguimiento posteriores. Las barras muestran la media \pm 95% del intervalo de confianza. GPSIII, tercera estación polínica; GPSIV, cuarta estación polínica, GPSV, quinta estación polínica. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

2.7 Relación entre respuesta Th2 y Treg

La generación de linfocitos T reguladores inducidos (iTreg) es extremadamente sensible a las citocinas efectoras, como la IL-4, que bloquea su diferenciación. Puesto que la proporción de células IL-4⁺ inducidas por alérgeno se redujo en un 54% de los pacientes al mes 4 de tratamiento, se comprobó si la generación de Treg estaba vinculada a este cambio. El descenso en la proporción de células IL-4⁺ al mes 4 con respecto al mes 1, se correlacionó con el aumento en el pool de linfocitos T $CD4^+ CD127^- CD45RA^- CD25^{high}$ (Figura 46).

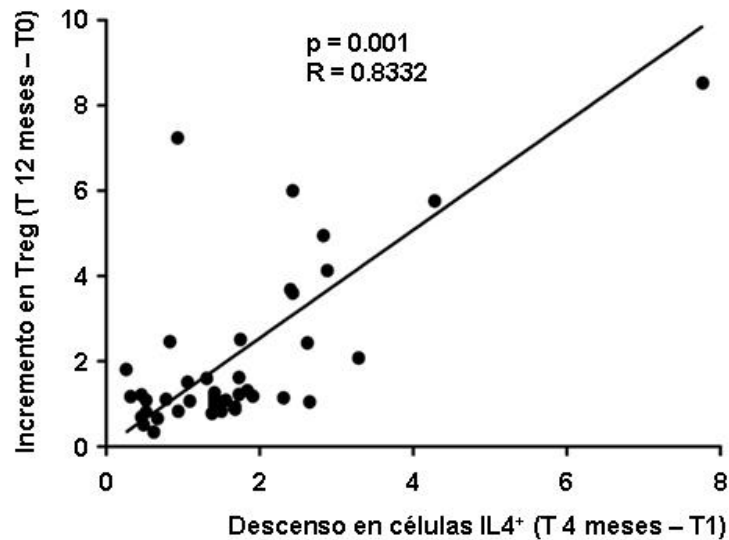


Figura 46. Correlación entre la reducción en la proporción de células IL-4⁺ al mes 4, con respecto al mes 1 de tratamiento, y el aumento en el porcentaje de linfocitos Treg con fenotipo CD4⁺ CD127⁻ CD45RA⁻ CD25^{high} al mes 12, con respecto a la situación basal. R, coeficiente de correlación de Pearson.

Estos datos sugieren que la proporción de linfocitos T IL4⁺ debe reducirse para poder generar una población de linfocitos Treg. Estos parámetros coinciden en un 70-75% de los pacientes, que muestran una reducción en la proporción de células IL-4⁺ entre los meses 1 y 4, junto con un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ CD127⁻ CD45RA⁻ CD25⁺ al mes 12 de tratamiento (Figura 47).

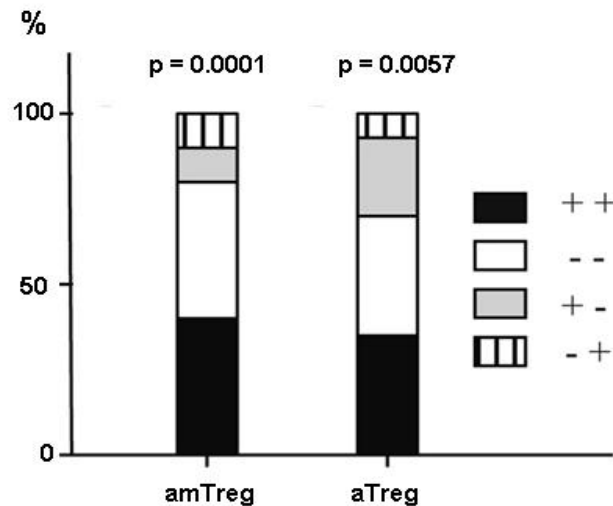


Figura 47. Porcentaje de pacientes que muestran: i) simultáneamente un descenso en la proporción de células IL4⁺ al mes 4 y un aumento en los Treg al mes 12 (barras negras), ii) ninguno de los dos (barras blancas), ó iii) únicamente una de las condiciones (descenso en IL4⁺, barras grises; o aumento en Treg, barras discontinuas). amTreg, linfocitos Treg memoria activados (CD4⁺ CD127⁻ CD45RA⁻ CD25^{high}); aTreg, linfocitos Treg activados (CD4⁺ CD45RA⁻).

Al comparar las variables, encontramos una coincidencia en el 40% de los pacientes, entre el aumento mantenido en la subpoblación celular con fenotipo Treg y los niveles reducidos de sIgE al finalizar el estudio con respecto a los niveles previos a la IT. Por su parte, el 33% de los sujetos no mostraron ni aumento en el pool Treg ni reducción de sIgE al finalizar el estudio. Mientras, en un 23% de los pacientes con inducción del pool Treg se observó un incremento de los valores de sIgE tras el tratamiento. Los pacientes con aumento en Treg y reducción en sIgE también mostraron menor eosinofilia durante las GPS con respecto al primer año de tratamiento (Figura 48).

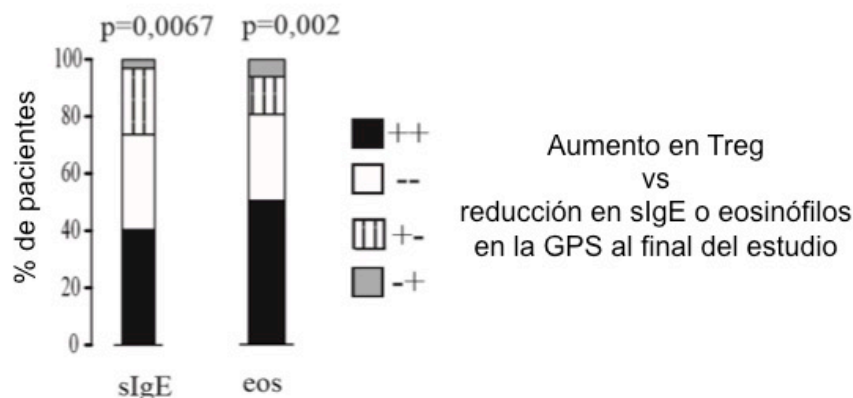


Figura 48. En la columna de la izquierda se representa el porcentaje de pacientes que muestran: i) simultáneamente un descenso en la proporción sIgE al final del estudio y un aumento en los Treg (barras negras), ii) ninguno de los dos (barras blancas), ó iii) únicamente una de las condiciones (descenso en sIgE, barras grises; o aumento en Treg, barras discontinuas). En la columna de la derecha, lo mismo pero relativo al descenso en los eosinófilos y el aumento en Treg. Se aplicó el Test de Fischer.

2.8 Resumen de la cinética de los cambios inmunológicos a los 2 años de tratamiento

La cinética de los cambios inmunológicos inducidos tras 2 años de tratamiento con los comprimidos liofilizados de gramíneas se resume en la Figura 49. Se observa un incremento inicial tanto de los niveles de IgE específica como de porcentaje de células productoras de IL4. Este aumento es máximo al mes de tratamiento y a partir del mismo, hay un descenso progresivo, que se asocia con un aumento de los niveles de IgG4 específica a partir del cuarto mes de tratamiento y con la instauración de una respuesta T reguladora de memoria a partir del año. Esta respuesta reguladora es estadísticamente significativa a nivel poblacional a partir del segundo año de tratamiento. El recuento eosinofílico presenta un acusado perfil estacional, siendo los recuentos

estadísticamente menores en el segundo año de tratamiento. Paralelamente se observa un descenso en las células productoras de IL5 en el segundo año de tratamiento. Hay un aumento progresivo de células productoras de IgG durante el primer año de tratamiento, que se mantiene durante el segundo año. La producción de IgG esta asociado principalmente a células del sistema inmune innato, fundamentalmente, células NK

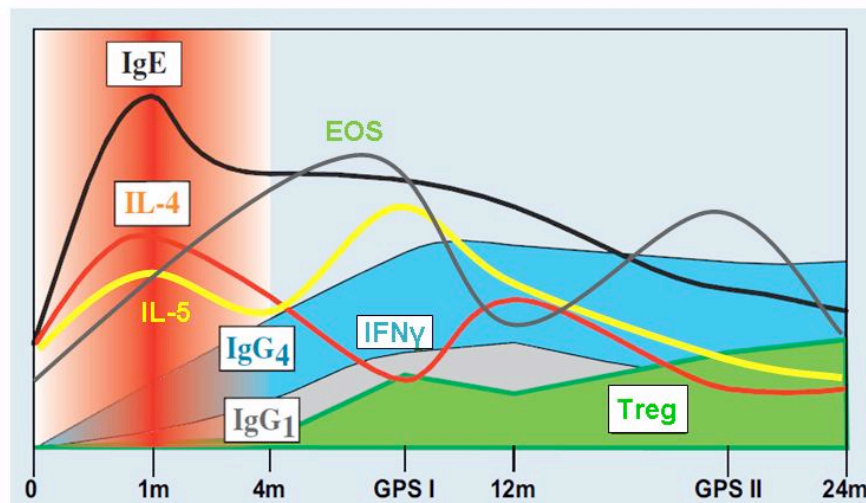


Figura 49. Resumen de la cinética de los cambios inmunológicos a los 2 años

2.9 Resumen de la cinética de los cambios inmunológicos a los 5 años

La cinética de los cambios inmunológicos identificados a los 5 años de iniciar el estudio, es decir, 3 años de tratamiento con los comprimidos liofilizados de gramíneas más 2 años de seguimiento sin IT, indica que el mantenimiento de la respuesta reguladora de memoria es clave para el sostenimiento tanto de un recuento eosinofílico controlado, como para mantener los niveles de IgE específica menores que los basales. Los pacientes que aumentaron sus niveles de IgE específica tras la suspensión del tratamiento, presentaron una mayor sintomatología alérgica, indicando una pérdida de efecto terapéutico.

DISCUSIÓN

A pesar de que la inmunoterapia específica con alérgenos se ha venido utilizando durante más de cien años, aspectos fundamentales de sus mecanismos permanecen sin esclarecer. La disponibilidad de nuevas vacunas avaladas por un desarrollo clínico sistemático y completo es, por lo tanto, una ocasión única para iniciar estudios prospectivos orientados a descubrir los mecanismos implicados y la sucesión temporal de los mismos. En este contexto, Grazax® es, hasta la fecha, el único producto disponible que ha documentado la eficacia clínica durante tres años de tratamiento y dos años después de suspender el mismo (96).

De este modo, se sabe que unos meses de tratamiento son suficientes para obtener un efecto clínico significativo y que su magnitud se establece el primer año de tratamiento. Dicho efecto es similar durante los dos años sucesivos de tratamiento activo y persiste al menos dos años después de su finalización.

En el presente estudio exploratorio se han analizado los efectos inmunológicos sistémicos inducidos por la administración de Grazax®, explorando la respuesta inmune humoral y celular al tratamiento, en muestras de sangre periférica. Grazax® es un liofilizado oral de polen de gramineas que se disuelve en los segundos posteriores a su administración via sublingual. Nuestro objetivo ha sido el determinar la cinética de los cambios inmunológicos individuales inducidos a lo largo del periodo de tratamiento de 3 años, comprobar si dichos cambios persisten a los 2 años de seguimiento, así como determinar biomarcadores precoces potenciales predictores de respuesta tardía, que se puedan incorporar tanto en estudios clínicos como en la práctica clínica diaria.

La capacidad de inclusión de pacientes y de análisis de las muestras de sangre, así como el elevado coste asociado a las determinaciones analíticas, limitó el estudio a un número máximo de 60 sujetos. La decisión de no incluir un grupo placebo se fundamentó en la necesidad de mantener un número suficiente de pacientes a la finalización del estudio. De hecho, solamente el 50% de los pacientes completaron los cinco años de duración el ensayo, lo que era de esperar, puesto que la adherencia a la inmunoterapia sublingual, que en este caso hay que administrar a diario durante todo el año, se sabe que puede ser relativamente baja (167). Haber incluido un grupo placebo, que previsiblemente habría supuesto una pérdida adicional de sujetos, no hubiera permitido alcanzar los objetivos del estudio.

Cambios inmunoológicos precoces inducidos por la SLIT

Las modificaciones iniciales inducidas por el tratamiento consistieron en un aumento en las respuestas de tipo Th2 asociadas al alérgeno (IL-4, sIgE y sIgG₄), que estaban claramente definidas al primer mes. En los pacientes sensibilizados, se postula que la formación de complejos entre la sIgE, el alérgeno y el receptor de baja afinidad para la IgE en la superficie de los linfocitos B y las células presentadoras, lleva a la activación de las respuestas mediadas por células, a través de la presentación facilitada del antígeno (168). La activación de los linfocitos T alérgeno-específicos induciría la expansión de la población de linfocitos de tipo Th2, esto haría que más linfocitos B se convirtieran en células plasmáticas productoras de sIgE, lo que exacerbaría la respuesta inmune asociada con la alergia. Nuestros datos apoyan esta hipótesis y proporcionan una explicación para el aumento precoz en los niveles

de sIgE, sIgG₄ y en la proporción de células IL-4⁺, que se detecta en los pacientes al mes de iniciar el tratamiento. De este modo, hemos observado que algunos pacientes llegan a aumentar hasta 30 veces los niveles de sIgE al mes de iniciar el tratamiento. Este hecho apoya las recientes observaciones que avalan la existencia de células de memoria productoras de sIgE (169).

En los meses sucesivos y tras la exacerbación inicial, hay un acusado descenso tanto de los niveles de sIgE como del porcentaje de células productoras de IL4. El 48% de los pacientes disminuyó los niveles de IL4 al cuarto mes de tratamiento respecto al máximo alcanzado al primer mes. Es muy probable que el aumento de los niveles de sIgG₄ y de la interferencia de la misma en los mecanismos de amplificación de la respuesta IgE ligada a CD23, juegue un papel clave en esta respuesta.

Varios estudios muestran un efecto bloqueante de anticuerpos séricos no IgE en la unión competitiva de la IgE con el alérgeno (168,170,171,172). En concreto, se considera que la sIgG₄ es un anticuerpo bloqueante efectivo, especulándose que sus características inmunológicas consiguen que esta subclase de IgG sea un inhibidor más eficaz de las reacciones mediadas por IgE (173,174,175).

A este respecto, los niveles de sIgG₄ no se relacionan directamente con la mejoría clínica. Sin embargo, los ensayos funcionales de actividad asociada a IgG sérica, como la inhibición de las interacciones alérgeno-IgE y de la IgE-FAB dependiente de CD23, se correlacionan con el resultado clínico y podrían servir como biomarcadores de respuesta (176,177). Nuestros resultados sugieren que el descenso de los niveles de sIgE con respecto al máximo al mes de tratamiento son indicativos de las respuestas de sIgG₄ de los

pacientes; y que los aumentos sistémicos en los niveles de sIgG₄ en los meses 1 y 4 se relacionan estrechamente con la regulación a la baja de las respuestas alérgicas (sIgE, FAB, IL-4) que se detectan más tarde durante el tratamiento, así como con la mejoría clínica subjetiva que experimentan los pacientes. Por lo tanto, dichos cambios inmunológicos podrían servir como biomarcadores precoces de respuesta inmunológica a la SLIT, cuya bondad habría que confirmar en estudios debidamente controlados con un número suficiente de pacientes.

Cambios inmunológicos inducidos por la SLIT al primer año de tratamiento

El descenso progresivo de los niveles de IL4 parece estar en la genesis del inicio de la respuesta reguladora y del efecto sostenido de la inmunoterapia. La inhibición de la presentación de antígeno facilitada por IgE podría abolir la activación de los linfocitos Th2 específicos de alérgenos y la subsiguiente producción de IL-4. En nuestro estudio, la inmunoterapia induce un aumento progresivo en la proporción de células productoras de IFN- γ .

Es interesante apuntar que la IL4 es un importante supresor de la síntesis de IFN- γ . Asimismo, es relevante que el aumento de IFN- γ se produce por tipos celulares distintos de los linfocitos T, fundamentalmente por células del sistema inmune innato (sobre todo NK) y es independiente de la estimulación antigénica. Por tanto, es el resultado de un cambio inmunológico causado por una regulación a la baja de la IL-4, en lugar de ser derivado de la generación de una respuesta genuina Th1 específica de alérgeno (178). Dicho de otra

manera, la posible generación de una respuesta Th1 antígeno específica no juega un papel relevante en el aumento de la producción de IFN- γ .

En la mitad de los pacientes se generó al año de tratamiento una población de linfocitos T CD4⁺ que muestran el fenotipo descrito para los linfocitos reguladores de memoria activados (165,166). Este aumento presentó una correlación muy significativa con el descenso a tiempos cortos de la producción de IL4. La generación de iTreg *in vitro* es muy sensible a las citocinas efectoras, tal como la IL-4, que bloquea la diferenciación de estos linfocitos iTreg (179,180,181). Nuestro estudio sugiere que la regulación a la baja de la IL-4 es el evento clave en la generación de una respuesta reguladora.

Cambios inmunológicos inducidos por la SLIT al segundo año de tratamiento

En el segundo año de tratamiento se producen distintos cambios significativos. Como hecho más relevante, alrededor del 80% de los pacientes desarrollan una respuesta reguladora de memoria, cuyo incremento es, por primera vez a lo largo del estudio, estadísticamente significativo a nivel poblacional. En paralelo a esta respuesta desaparece el pico estacional de IgE y no se producen oscilaciones en la respuesta IL4 durante la estación polínica.

En el primer año, se observó un descenso de la población productora de IL4 durante la estación polínica, lo que constituye un posible indicio de un reclutamiento de células efectoras periféricas a la vía aérea, que posteriormente se recuperó. Esta variación desapareció el segundo año, estando además los niveles significativamente disminuidos respecto al valor inicial. Además, se observó una falta de producción estacional de IL-5 por los

linfocitos y la reducción en los recuentos de eosinófilos en relación con la primera estación polínica.

Por su parte, los valores de sIgE siguen disminuyendo, aunque todavía son mayores que los basales; y los valores de sIgG₄ alcanzan su máximo a nivel poblacional. Los estudios previos indican que la inmunoterapia exitosa implica una regulación a la baja de la respuesta Th2, la producción de anticuerpos bloqueantes y la generación de linfocitos Treg (141).

Como resumen, hasta el momento en este estudio, hemos demostrado que la inmunoterapia con tabletas de gramíneas induce un aumento en las respuestas humoral (sIgE y sIgG₄) y Th2 durante las primeras 4 semanas de tratamiento. La producción aumentada de sIgE al primer mes es indicativa de una respuesta de sIgG₄ en los pacientes. La producción de anticuerpos bloqueantes y sIgG₄ se correlaciona con un descenso en la síntesis de sIgE y en la respuesta Th2 IL-4⁺. La reducción en la proporción de células productoras de IL-4 se correlaciona con el aumento en la proporción de linfocitos T con un fenotipo regulador. En el segundo año de tratamiento, la desensibilización al alérgeno es evidente, sugiriendo que hemos conseguido generar un estado anérgico en la mayor parte de los pacientes.

Cambios inmunológicos inducidos por la SLIT a largo plazo

Por los datos de que disponemos, este es el primer estudio prospectivo de 5 años de duración, en el que se exploran los mecanismos inmunológicos asociados al mantenimiento del efecto de la intervención terapéutica en enfermedades alérgicas con inmunoterapia específica. El producto elegido es

el único que cuenta con eficacia clínica demostrada en estudios prospectivos y debidamente controlados con una duración de 5 años.

A la vista de nuestros resultados, formulamos la hipótesis de que el mantenimiento de la respuesta Treg tras la finalización del tratamiento podría jugar un papel clínico fundamental en la persistencia de la desensibilización. Es interesante considerar que una proporción de los pacientes que desarrollan respuesta Treg la pierden progresivamente tras finalizar la inmunoterapia, a la vez que muestran aumentos en la sIgE y los recuentos de eosinófilos.

Considerando los datos de los 5 años, se puede concluir que, aproximadamente, el 15% de los pacientes no desarrolla una respuesta Treg al tratamiento durante los tres años. Se precisan hasta 2 años de tratamiento para inducir esta respuesta en los pacientes capaces de generar regulación T. Un tercer año de terapia no aumenta la proporción de pacientes respondedores. Tras 2 años de seguimiento, una vez se ha finalizado el ciclo de 3 años de tratamiento, otro 20% de pacientes no mantiene el beneficio clínico. Esta nueva manera de entender el efecto de la inmunoterapia, gracias a nuestro estudio, abre una vía para identificar pacientes respondedores precoces, tardíos y mantenidos, lo que puede permitir el diseño de mejores estrategias de intervención terapéutica.

El efecto a corto plazo que se observa con la IT no se explica por los cambios inmunológicos periféricos. De hecho, durante los primeros meses, se ha objetivado un aumento tanto en la sIgE como en la proporción de células IL4+, lo que debería acompañarse en teoría de un empeoramiento clínico, cuando se suele observar justo lo contrario. A este respecto, se puede formular la teoría de que otros mecanismos locales asociados con la sensibilidad de las células

efectoras podrían ser relevantes con respecto a la mejoría clínica precoz asociada a la SLIT, que predeciría el inicio de la tolerancia periférica dirigida por la señalización de células dendríticas. En relación con esta hipótesis, recientemente nuestro grupo de investigación ha descrito la existencia de un remodelado de la mucosa oral y una infiltración de células efectoras. La colocalización de células presentadoras y CD4+, junto con el contacto de la SLIT con los mastocitos en el tejido conectivo de la mucosa oral, avalan esta hipótesis (182).

Hay que destacar la existencia de una variabilidad considerable en la cinética individual de cambios inmunológicos en respuesta a la SLIT. Como ejemplo, los niveles de sIgG₄ suelen mostrar un aumento inicial de hasta 10 veces los niveles basales, seguidos, como en el caso de la sIgE, de un fuerte descenso. Dicho aumento inicial, que persiste un número limitado de meses, presenta un retraso de entre 2 meses y 2 años con respecto a los cambios en la sIgE, lo que puede explicar la dificultad para vincular la sIgG₄ con la mejoría clínica. Se puede postular que el descenso en ambas inmunoglobulinas está controlado por la respuesta Treg en proceso, que como hemos descrito puede precisar en algunos casos hasta 2 años para consolidarse.

Como resumen, este trabajo permite construir un marco temporal adecuado para los mecanismos descritos de acción de la inmunoterapia específica con alérgenos, que podría tener claras consecuencias para, por ejemplo, el diseño de ensayos clínicos. Los productos dirigidos a actuar a nivel de regulación T, deberían diseñarse probablemente para tener una duración mínima de 2 años de tratamiento consecutivos, mientras que, para conseguir un efecto precoz

mediado por la desensibilización de células efectoras, se podría precisar la utilización de IT a altas dosis.

A pesar de las nuevas ideas sobre los mecanismos que están implicados en el efecto de la IT, se precisan mejores estrategias de diagnóstico que permitan el descubrimiento de nuevos biomarcadores de respuesta. Estos biomarcadores deberían estar más en relación con el estado inflamatorio de los pacientes, que estaría a su vez más estrechamente relacionado con sus síntomas.

Para sintetizar nuestras observaciones, en la Figura 50 se resume la cinética de los cambios inmunológicos identificados a los 5 años de iniciar el estudio, es decir, 3 años de tratamiento con los comprimidos liofilizados de gramíneas más 2 años de seguimiento sin IT.

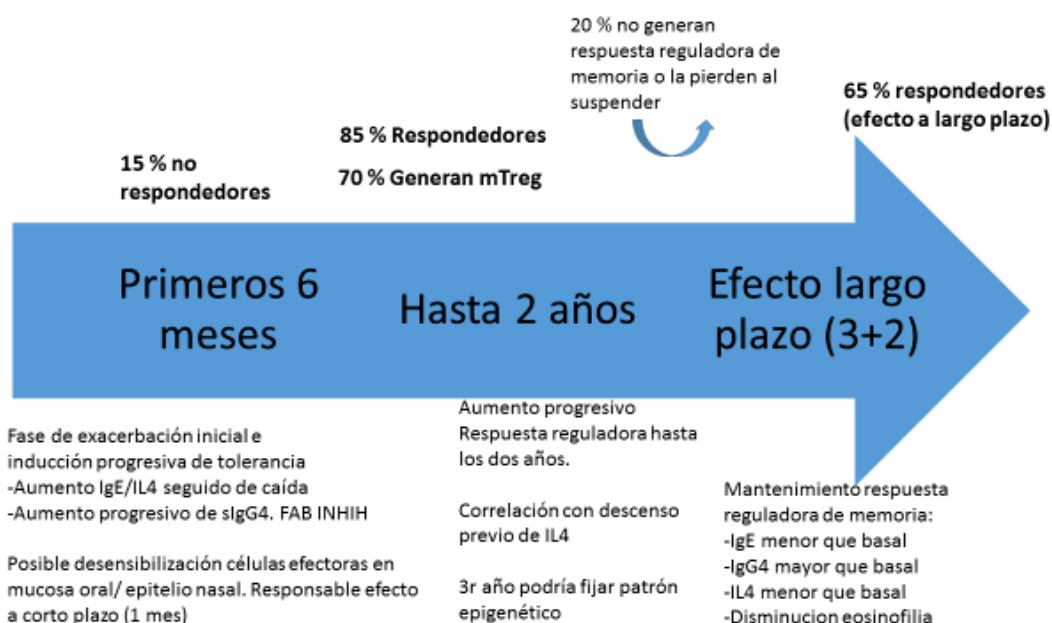


Figura 50. Resumen de la secuencia temporal de los mecanismos implicados en la inmunoterapia sublingual con Grazax®

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten comprender mejor los mecanismos implicados en la inmunoterapia específica y entender la variabilidad individual de los pacientes en la respuesta al tratamiento. Se han identificado posibles biomarcadores de respuesta asociados a la generación de la respuesta reguladora. Algunos de estos marcadores, como la cinética de sIgE son de fácil implantación y pueden incorporarse a estudios prospectivos. Por ejemplo, para predecir en qué pacientes desaparece el efecto de la inmunoterapia tras suspender el tratamiento.

Los datos obtenidos sugieren que la administración de inmunoterapia debe realizarse de modo continuado al menos dos años consecutivos. Recientemente se ha publicado un trabajo en el que la administración por un periodo de dos años no fue suficiente para generar efecto sostenido (183). Este hecho implica que es probable que el tercer año de terapia sea clave para fijar el patrón de regulación epigenético de dicha respuesta y que algunos de los pacientes que pierden regulación tras interrumpir la SLIT podrían necesitar un periodo adicional de tratamiento activo.

CONCLUSIONES

1. El tratamiento con Grazax® induce un aumento de la respuesta Th2 a corto plazo, seguido de una disminución acusada a lo largo de los meses posteriores.
2. La generación de IgG₄ específica a partir del mes de tratamiento puede jugar un papel relevante en dicha regulación, interfiriendo con la unión al alérgeno facilitada por IgE a los linfocitos B, vía receptor de baja afinidad de la IgE.
3. En paralelo a la respuesta IgE, se produce un ascenso y descenso en el porcentaje de células productoras de IL4.
4. El descenso de IL4 permite aumentar la producción de IFN- γ , principalmente por células NK.
5. La generación de una respuesta reguladora de memoria a partir del primer año, está directamente relacionada con la disminución de IL4 tras el pico al mes de iniciar la inmunoterapia.
6. La respuesta reguladora de memoria se establece a nivel poblacional a partir del segundo año de tratamiento, de manera que alrededor del 85% de los pacientes generan una respuesta T reguladora de memoria.
7. Al suspender el tratamiento después de tres años, alrededor del 20% de los pacientes no son capaces de mantener esta respuesta reguladora, mientras que el 65% restante la conservan.
8. El mantenimiento de la respuesta reguladora se asocia al control de los recuentos de eosinófilos y niveles de IgE, que a su vez se asocia con el sostenimiento de la eficacia clínica.
9. Hay biomarcadores de fácil acceso, como la cinética de IgE, que nos permitirían mejorar el seguimiento del efecto en el paciente sometido a tratamiento con inmunoterapia.

REFERENCIAS

-
- 1 Coombs R, Gell P. The classification of allergic reactions underlying disease. En Gell P & Coombs R, Clinical aspects of immunology, chapter 13 (págs. 217-237). Oxford: Blackwell Scientific Publications.
 - 2 von Mutius E. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: farm lifestyles and the hygiene hypothesis. Clin Exp Immunol 2010; 160: 130-5.
 - 3 Pawankar R, Canonica GW, Holgate ST, Lockey RF. Libro Blanco sobre Alergia de la WAO. 2011.
 - 4 Huerta J, Del Olmo H, Valdés A. Prevalencia y factores asociados de rinitis alérgica y dermatitis atópica en niños. Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas 2008; 17: 56.
 - 5 Hanania NA, King MJ, Braman SS, Saltoun C, Wise RA, Enright P, et al. Asthma in the elderly: current understanding and future research needs—a report of a National Institute on Aging (NIA) workshop. J Allergy Clin Immunol 2011;128: S4-24).
 - 6 Yang IV1, Schwartz DA. Epigenetic mechanisms and the development of asthma. J Allergy Clin Immunol 2012; 130: 1243-55.).
 - 7 Jutel M, Agache I, Bonini S, Burks AW, Calderon M, Canonica W, et al. International consensus on allergy immunotherapy. J Allergy Clin Immunol 2015; 136: 556-68.).
 - 8 Ker J1, Hartert TV. The atopic march: what's the evidence? Ann Allergy Asthma Immunol 2009; 103: 282-9.
 - 9 Thomsen SF. Epidemiology and natural history of atopic diseases. Eur Clin Respir J 2015 Mar 24; 2.
 - 10 International Consensus Report on Diagnosis and Management of Rhinitis. International Rhinitis Management Working Group. Allergy 1994; 49 (19 Suppl): 1-34.
 - 11 Dykewicz MS, Fineman S. Executive Summary of Joint Task Force Practice Parameters on Diagnosis and Management of Rhinitis. Asthma Immunol 1998; 81: 463-8.
 - 12 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; 5: 485-96.
 - 13 Lundback B. Epidemiology of rhinitis and asthma. Clin Exp Allergy 1998; 2: 3-10.
 - 14 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; 63: 8-160.
 - 15 Bauchau V, Durham SR. Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. Eur Respir J 2004; 24: 758-64.
 - 16 Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Sistema de información de Atención Primaria (SIAP). (2013).
 - 17 Navarro A, Colás C, Antón E, Conde J, Dávila I, Dordal MT et al. Rhinoconjunctivitis Committee of the SEAIC. Epidemiology of allergic rhinitis in allergy consultations in Spain: Alergológica-2005. J Investig Allergol Clin Immunol 2009; 19 (Suppl 2): 7-13.

-
- 18 Shaaban R, Zureik M, Soussan D, et al. Rhinitis and onset of asthma: a longitudinal population-based study. *Lancet* 2008; 372: 1049-57.
 - 19 Rochat MK, Illi S, Ege MJ, Lau S, Keil T, Wahn U et al. Multicentre Allergy Study (MAS) group. Allergic rhinitis as a predictor for wheezing onset in school-aged children. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 1170-5.e2.
 - 20 Marple BF, Fornadley JA, Patel AA, Fineman SM, Fromer L, Krouse JH et al. Keys to successful management of patients with allergic rhinitis: focus on patient confidence, compliance, and satisfaction. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 136: S107-24.
 - 21 Canonica GW, Bousquet J, Mullol J, et al. A survey of the burden of allergic rhinitis in Europe. *Allergy* 2007;(Suppl 85):17-25).
 - 22 Colás C, Antón E, Montoro J, Dávila I, Dordal MT, Ibáñez MD et al. Costes directos e indirectos de la rinitis alérgica en España. En: Colás C, Fraj J, Garcés MM, Lezaun A, Segura N, eds. Libro de Resúmenes de las Ponencias a la Reunión Anual de la Asociación Aragonesa de Alergia (Alergoaragon). Sallent de Gállego (Huesca), 5 a 9 de febrero de 2012. Alergoaragón. Zaragoza 2012. p: 13-26. ISBN 978-84-87944-41-3.
 - 23 Proud D, Leigh R. Epithelial cells and airway diseases. *Immunol Rev* 2011; 242: 186-204.
 - 24 Huby RDJ, Dearman RJ, Kimber I. Why are some proteins allergens? *Toxicol Sci* 2000; 55: 235-46.179
 - 25 Musu T, Grégoire C, David B, Dandeu JP. The relationships between the biochemical properties of allergens and their immunogenicity. *Clin Rev Allergy Immunol* 1997; 15: 485-98.]
 - 26 Adkis CA. Allergy and hypersensitivity: mechanisms of allergic disease. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 718-26.].
 - 27 Miyata M, Hatsushika K, Ando T, Shimokawa N, Ohnuma Y, Katoh R et al. Mast cell regulation of epithelial TSLP expression plays an important role in the development of allergic rhinitis. *Eur J Immunol* 2008; 38: 1487-92.
 - 28 Naclerio RM. Allergic rhinitis. *N Engl J Med* 1991; 325: 860-9.
 - 29 Pawankar R, Mori S, Ozu C, Kimura S. Overview of the pathomechanisms of allergic rhinitis. *Asia Pac Allergy* 2011; 1:157-67.
 - 30 Sin B, Togias A. Pathophysiology of allergic and non-allergic rhinitis. *Proc Am Thorac Soc* 2011; 8: 106-11.
 - 31 Raap U, Braunstahl GJ. The role of neurotrophins in the pathophysiology of allergic rhinitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010; 10: 8-13.
 - 32 Naclerio R, Meier H, Kagey-Sobotka A, Adkinson N, Meyers D, Norman P et al. Mediator release after nasal airway challenge with allergen. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 597-602.
 - 33 Peters-Golden M, Gleason MM, Togias A. Cysteinyl leukotrienes: multifunctional mediators in allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2006; 36: 689-703.
 - 34 Frieri M. Inflammatory issues in allergic rhinitis and asthma. *Allergy Asthma Proc* 2005; 26: 163-9.

-
- 35 White M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: S378-81.
- 36 Kita H. Eosinophils. *Immunol Rev* 2011; 242: 161-77.
- 37 Salib RJ, Kumar S, Wilson SJ, Howarth PH. Nasal mucosal immunoexpression of the mast cell chemoattractants TGF-beta, eotaxin, and stem-cell factor and their receptors in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 799-806.
- 38 Saenz SA, Taylor BC, Artis D. Welcome to the neighborhood. Epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptative immune responses at mucosal sites. *Immunol Rev* 2008; 226: 172-90.]
- 39 Mori S, Pawankar R, Ozu C, Nonaka T, Okubo K. Expression and roles of MMP-2, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, and TIMP-2 in allergic nasal mucosa. *Allergy Asthma Immunol Res* 2012; 4: 231-9
- 40 Dobrina A, Menegazzi R, Carlos T, Nardon E, Cramer R, Zacchi T, Harlan J, Patriarca P. Mechanisms of eosinophil adherence to cultured vascular endothelial cells: eosinophils bind to the cytokine-induced endothelial ligand vascular cell adhesion molecule-1 via the very late activation antigen-4 integrin receptor. *J Clin Invest* 1991; 88: 20-6
- 41 Schroeder JT. Biology of basophils. En: Adkinson NF, Bochner BS, Burks AW, Busse WW, Holgate ST, Lemanske Jr RF, eds. *Middleton's Allergy principles and practice*. 8^a ed. Philadelphia: Saunders, an imprint of Elsevier Inc.; 2014. p.252-264
- 42 Kita H, Bochner BS. Biology of Eosinophils. En : Adkinson NF, Bochner BS, Burks AW, Busse WW, Holgate ST, Lemanske Jr RF, eds. *Middleton's Allergy principles and practice*. 8^a ed. Philadelphia: Saunders, an imprint of Elsevier Inc.; 2014. p. 265-79
- 43 Weller P, Lee C, Foster D, Corey E, Austen K, Lewis R. Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils: predominant production of leukotriene C4. *Proc Ntl Acad Sci USA* 1983; 80: 7626-30.
- 44 Wang D, Smitz J, Waterschoot S, Clement P. An approach to the understanding of the nasal early-phase reaction induced by nasal allergen challenge. *Allergy* 1997; 52:162-7.
- 45 Knani J, Campbell A, Enander I, Peterson CGB, Michel FB, Bousquet J. Indirect evidence of nasal inflammation assessed by titration of inflammatory mediators and enumeration of cells in nasal secretions of patients with chronic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 880-9.
- 46 Pawankar R, Okuda M, Hasegawa S, Suzuki K, Yssel H, Okubo K, Okumura K, Ra C. Interleukin-13 expression in the nasal mucosa of perennial allergic rhinitis. *Am J Resp Crit Care Med* 1995; 152:2059-67.
- 47 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; 59: 204-12.
- 48 Frew AJ. Allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: S306-13.
- 49 Shamju MH, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy to aeroallergens. *Clin Exp Allergy* 2011; 41: 1235-46.

-
- 50 Till S. Mechanisms of immunotherapy and surrogate markers. *Allergy* 2011; 66: 25-7.
- 51 Holgate ST. Innate and adaptative immune responses in asthma. *Nat Medicine* 2012; 18: 673-83.
- 52 Shedden A. Impact of nasal congestion on quality of life and work productivity in allergic rhinitis. *Treat Respir Med* 2005; 4: 439-46.
- 53 Juniper EF, Guyatt GH. Development and testing of a new measure of health status for clinical trials in rhinoconjunctivitis. *Clin Exp Allergy* 1991; 21: 77-83.
- 54 Leynaert B, Neukirch C, Liard R, Bousquet J, Neukirch F. Quality of life in allergic rhinitis and asthma. A population-based study of young adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1391-6.
- 55 Position paper: Allergen standardization and skin tests. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1993; 48: S48-82.
- 56 Dordal MT, Lluch-Bernal M, Sánchez MC, Rondón C, Navarro A, Montoro J et al (SEAIC Rhinoconjunctivitis Committee). 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: 1-12
- 57 Johanson SG . ImmunoCAP® Specific IgE test: an objective tool for research and routine allergy diagnosis. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2004; 4: 273-9
- 58 Hamilton RG. Clinical laboratory assessment of immediate-type hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2010, 125: S284-96.
- 59 Sicherer SH, Leung DY. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis and hypersensitivity reactions to foods, drugs and insects in 2009. *J Allergy Clin Immunol* 2010: 85-97.
- 60 Blackley C. *Experimetal Researches of the Nature and Causes of Catarrhus Aestivus*. London: Bailier, Tindal and Cox; 1873.
- 61 Subiza E, Subiza J, Jerez M. Árboles, hierbas y plantas de interés alergológico en España . In: Asomba A, editor. *Tratado de alergología 4*. Madrid: SEAIC- Bayer; 1986. p.257-366.
- 62 Subiza J, Jerez M, Jiménez JA, Narganes MJ, Cabrera M, Varela S, et al. Allergenicpollen polinosis in Madrid. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;96:15-23.
- 63 Bagni N, Charpin H, Davies RR, Nolard N, Stix E. City pore concentrations in the European Economic Community (EEC) I. Grass polen, 1973.*Clin Allergy*. 1976; 6:61-8
- 64 Lewis WH. Grasses and grasslike plants. In: Lewis WH, Vinay P, Zener VE, eds. *Airborne and allergic pollens of North America*. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press; 1983.p. 105-28.
- 65 Subiza E, Subiza J, Jerez M. Aerobiología de las gramíneas. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin*. 1989; 4: 45-50
- 66 Weeke ER, SF. Allergofenic significance of Graminae (Poaceae). In: D “ Amato SF, Bonini S, eds. *Allergenic pollen and polinosis in Europe*. London: Blackwell Scientific Publications;1991. P.109-12.

-
- 67 Subiza J, Jerez M, Subiza E. Introducción a la aerobiología de las gramíneas. *Rev Esp Alergol Inmunol Clín.* 1992; 7: 151-61).
- 68 Knox RB. Grass pollen, thunderstorms and asthma. *Clin Exp Allergy.* 1993; 23:354-9).
- 69 Subiza JL, Subiza J, Barjau MC, Rodríguez R, Gavilán MJ. Inhibition of the seasonal IgE increase to *Dactylis glomerata* by daily sodium chloride nasal-sinus irrigation during the grass pollen season. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104:711-2.
- 70 Bauchau V, Durham SR. Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *Eur Respir J* 2004; 24:758-764.
- 71 Juniper EF. Rhinitis management: The patient's perspective. *Clin Exp Allergy* 1998;28(Suppl 6):34-38).
- 72 Subiza J, Masiello JM, Subiza JL, Jerez M, Hinojosa M, Subiza E. Prediction of annual variations in atmospheric concentrations of grass pollen. A method based on meteorological factors and grain crop estimates. *Clin Exp Allergy.* 1992;22:540-6.
- 73 Smith M, Jager S, Berger U, Sikoparija B, Hallsdottir M, Sauliene I, et al. Geographic and temporal variations in pollen exposure across Europe. *Allergy.* 2014; 69: 913-23.
- 74 Montero MT, López C, Jiménez JA, Subiza J. Characterization of allergens from *Trisetum paniceum* pollen: an important aeroallergen in Mediterranean continental climatic areas. *Clin Exp Allergy.* 1997; 27:1442-8.
- 75 Valenta R, Vrtala S, Ebner C, Kraft D, Scheiner O. Diagnosis of grass pollen allergy with recombinant timothy pollen (*Phleum pratense*) pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 1992;97:287-94.
- 76 Aasmul-Olsen S, Wurtzen PA, Lombardero M, Lowenstein H, Ipsen H. Characterization of group 1 allergens from eleven grass species. *Adv Exp Med Biol.* 1996;409:261-5.36-40.
- 77 Becker WM, Petersen A, Schlaak M. Characterization of allergens of timothy grass (*Phleum pratense*). *Immun Infekt.* 1993;21:37-8.
- 78 Mohapatra SS, Lockey RF, Shirley S. Immunobiology of grass pollen allergens. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2005;5:381-7.
- 79 Vrtala S, Susani M, Sperr WR, Valent P, Laffer S, Dolecek C, et al. Immunologic characterization of purified recombinant timothy grass pollen (*Phleum pratense*) allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5). *J Allergy Clin Immunol.* 1996;97:781-7.
- 80 Vrtala S, Fischer S, Grote M, Vangelista L, Pastore A, Sperr WR, et al. Molecular, immunological, and structural characterization of Phl p 6, a major allergen and P-particle-associated protein from Timothy grass (*Phleum pratense*) pollen. *J Immunol.* 1999;163: 5489-96.
- 81 Johansen N, Weber RW, Ipsen H, Barber D, Broge L, Hejl C. Extensive IgE cross-reactivity towards the Pooideae grasses substantiated for a large number of grass-pollensensitized subjects. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009;150: 325-34.
- 82 Duffort O, Quintana J, Ipsen H, Barber D, Polo F. Antigenic similarity among group 1 allergens from grasses and quantitation ELISA using monoclonal antibodies to Phl p 1. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008;145:283-90.

-
- 83 Wilson DR, Torres Lima M, Durham SR. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2005; 60:4-12.
- 84 White P, Smith H, Baker N, et al. Symptom control in patients with hay fever in UK general practice: how well are we doing and is there a need for allergen immunotherapy? *Clin Exp Allergy* 1998; 28:266-270).
- 85 Calderón MA, Simons FE, Malling HJ, Lockey RF, Moingeon P, Demoly P. Sublingual allergen immunotherapy: mode of action and its relationship with the safety profile. *Allergy* 2012;67:302-11.
- 86 Allam JP, Novak N. Local immunological mechanisms of sublingual immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011;11:571-8.
- 87 Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 1911; 1: 1572-3.
- 88 Freeman J. Further observations on the treatment of hay fever by hypodermic inoculations of pollen vaccine. *Lancet* 1911; 2: 814-7.
- 89 Barber D, Díaz-Perales A, Villalba M, Chivato T. Challenges for allergy diagnosis in regions with complex pollen exposures. *Curr Allergy Asthma Rep* 2015; 15 :1-10.
- 90 Walker SM, Varney VA, Gaga M, et al .Grass pollen immunotherapy: efficacy and safety during a 4year follow-up study. *Allergy* 1995; 50:405-413.
- 91 Varney VA, Gaga M, Frew AJ, et al. Usefulness of immunotherapy in patients with severe summer hay fever uncontrolled by antiallergic drugs. *BMJ* 1991; 302:265-269.
- 92 André C, Vatrinet C, Galvain S, et al. Safety of sublingual-swallow immunotherapy in children and adults. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 16(3):162-168.
- 93 Dahl R, Kapp A, Colombo G, de Monchy JG, Rak S, Emminger W, Rivas MF, Ribel M, Durham SR. Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass allergen tablets for seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118: 434-40.
- 94 Dahl R1, Kapp A, Colombo G, de Monchy JG, Rak S, Emminger W, Riis B, Grønager PM, Durham SR. Sublingual grass allergen tablet immunotherapy provides sustained clinical benefit with progressive immunologic changes over 2 years.J *Allergy Clin Immunol*. 2008; 121: 512-518.
- 95 Durham SR, Emminger W, Kapp A, Colombo G, de Monchy JG, Rak S, et al. Long-term clinical efficacy in grass pollen-induced rhinoconjunctivitis after treatment with SQ-standardized grass allergy immunotherapy tablet. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:131-8.
- 96 Durham SR, Emminger W, Kapp A, de Monchy JG, Rak S, Scadding GK, et al. SQ-standardized sublingual grass immunotherapy: confirmation of disease modification 2 years after 3 years of treatment in a randomized trial. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:717-26.
- 97 Dieguez I, Sanz ML, Oehling A. Influence of seasonal variations on histamine release and other immunological parameters in polinosis. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1991;1:101-108.

-
- 98 van Ree R, Van Leeuwen WA, Dieges PH, Van Wijk RG, De Jong N, Brewczynski PZ et al. Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1997;27:68-74.
- 99 Larché M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanism of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006;6:761-771.
- 100 Akdis M, Akdis CA. Mechanism of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:780-789.
- 101 Jayasekera NP, Toma TP, Williams A, Rajakulasingam K. Mechanism of immunotherapy in allergic rhinitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2007;61:29-33.
- 102 James LK, Durham SR. Update on mechanisms of allergen injection immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2008;38:1074-1088.
- 103 Shamji MH, Durham SR. Mechanism of immunotherapy to aeroallergens. *Clin Exp Allergy* 2011;41:1235-1246.
- 104 Gleich GJ, Zimmermann EM, Henderson LL, Yunginger JW. Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six-year prospective study. *J Allergy Clin Immunol* 1982;70:261-271.
- 105 Rossi RE y cols. Evaluation of recombinant and native timothy pollen (rPhl p 1, 2, 5, 6, 7, 11, 12 and nPhl p 4)- specific IgG4 antibodies induced by subcutaneous immunotherapy with timothy pollen extract in allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;135:44-53.
- 106 Rossi RE, Monasterolo G, Coco G, Silvestro L, Operti D. Evaluation of serum IgG4 antibodies specific to grass pollen allergen components in the follow up of allergic patients undergoing subcutaneous and sublingual immunotherapy. *Vaccine* 2007;25:957-964.
- 107 Wachholz PA, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4:313-318.
- 108 Jabara HH, Loh R, Ramesh N, Vercelli D, Geha RS. Sequential switching from mu to epsilon via gamma 4 in human B cells stimulated with IL-4 and hydrocortisone. *J Immunol* 1993;151:4528-4533.
- 109 Van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Söllner 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;131:1204-1212.
- 110 Adkis CA, Blesken T, Adkis M, Wüthrich B, Blazer K. Role of IL-10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998;102:98-106.
- 111 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;121:1120-1125.
- 112 Nouri-Aria KT, Wachholz PA, Francis JN, Jacobson MR, Walker SM, Wilcock LK, et al. Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol* 2004; 172:3252-3259.

-
- 113 Pilette C, Nouri-Aria KT, Jacobson MR, Wilcock LK, Detry B, Walker SM et al. Grass pollen immunotherapy induces an allergen-specific IgA2 antibody response associated with mucosal TGF-beta expression. *J Immunol* 2007;178:4658-4666.
- 114 Jutel M, Adkis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszczyk M, Blazer K et al. IL-10 and TGF- β cooperate in regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003;33:1205-1214.
- 115 Cooke RA, Barnard JH, Hebdall S, Stull A. Serological evidence of immunity with coexisting sensitization in a type of human allergy (hay fever). *J Exp Med* 1935;62:733-750.
- 116 Shamji MH, James LK, Durham SR. Serum immunologic markers for monitoring allergen-specific immunotherapy. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2011;31:311-23.
- 117 Scadding GW, Shamji MH, Jacobson MR, Lee DI, Wilson D, Lima MT, et al. Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B cells. *Clin Exp Allergy* 2010;40:598-606.
- 118 Uermösi C, Zabel F, Manolova V, Bauer M, Beerli RR, Senti G et al. IgG-mediated down-regulation of IgE bound to mast cells: a potential novel mechanism of allergen-specific desensitization. *Allergy* 2014;69:338-347.
- 119 Brunet C, Bedart PM, Lavoie A, Jobin M, Hebert J. Allergic rhinitis to ragweed pollen II. Modulation of histamine-releasing factor production by specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:87-94.
- 120 Faith A, Richards DF, Verhoef A, Lamb JR, Lee TH, Hawrylowicz CM. Impaired secretion of interleukin-4 and interleukin-13 by allergen-specific T cells correlates with defective nuclear expression of NF-AT2 and jun B:relevance to immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2003;33:1209-1215.
- 121 Wachholz PA, Nouri-Aria KT, Wilson DR, Walker SM, Verhoef A, Till SJ et al. Grass pollen immunotherapy for hayfever is associated with increases in local nasal but not peripheral Th1:Th2 cytokine ratios. *Immunology* 2002;105:56-62.
- 122 Francis JN, Till SJ, Durham SR. Induction of IL-10+CD4+CD25+T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:1255-1261
- 123 Guerra F, Carracedo J, Solana-Lara R, Sánchez-Guijo P, Ramírez R. TH2 lymphocytes from atopic patients treated with immunotherapy undergo rapid apoptosis after culture with specific allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:64:647-653.
- 124 Stanic B, van de Veen W, Wirz O, Rückert B, Morita H, Söllner S, et al. IL-10 overexpressing B cells regulate innate and adaptative immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135: 771-80.
- 125 Akdis M, Akdis CS. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133: 621-31.
- 126 Canonica GW, Bousquet J, Casale T, Lockey RF, Baena-Cagnani CE, Pawankar R, et al. Sub-lingual immunotherapy: world allergy organization position paper 2009. *World Allergy Organ J* 2009;2:233-281.

-
- 127 Brozek JL, Bousquet J, Baena-Cagnani CE, Bonini S, Canonica GW, Casale TB, et al. Global Allergy and Asthma European Network; Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation Working Group. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:466-476
- 128 Novak N, Haberstick J, Bieber T, Allam JP. The immune privilege of the oral mucosa. *Trends Mol Med* 2008;14:191-198.
- 129 Allam JP, Novak N, Fuchs C, Asen S, Bergé S, Appel T, et al. Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive FcεpsilonR1 expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:141-148.
- 130 Mascarell L, Lombardi V, Zimmer A, Louise A, Tourdot S, Van Overtvelt L, et al. Mapping of the lingual immune system reveals the presence of both regulatory and effector CD4+ T cells. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1910-1919.
- 131 Bagnasco M, Passalacqua G, Villa G, Augeri C, Flamigni G, Borini E, et al. Pharmacokinetics of an allergen and a monomeric allergoid for oromucosal immunotherapy in allergic volunteers. *Clin Exp Allergy* 2001;31:54-60.
- 132 Allam JP, Würtzen PA, Reinartz M, Winter J, Vrtala S, Chen KW, et al. Plp 5 resorption in human oral mucosa leads to dose-dependent and time-dependent allergen binding by oral mucosal Langerhans cells, attenuates their maturation, and enhances their migratory and TGF-beta1 and IL-10-producing properties. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:638-645
- 133 Allam JP, Peng WM, Appel T, Wenghoefer M, Niederhagen B, Bieber T, et al. Toll-like receptor 4 ligation enforces tolerogenic properties of oral mucosal Langerhans cells. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:368-374
- 134 Sun JB, Xiang Z, Smith KG, Holmgren J. Important role for FcγRIIB on B lymphocytes for mucosal antigen-induced tolerance and Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2013;191:4412-4422
- 135 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;130:215-224.
- 136 Didier A, Malling HJ, Worm M, Horak F, Jäger S, Montagut A, et al. Optimal dose, efficacy, and safety of once-daily sublingual immunotherapy with a 5-grass pollen tablet for seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:1338-1345
- 137 Antúnez 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;19:210-218
- 138 Baron-Bodo V, Horiot S, Lautrette A, Chabre H, Drucbert AS, Danze PM, et al. Heterogeneity of antibody responses among clinical responders during grass pollen sublingual immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2013;43:1362-1373
- 139 Malling HJ, Lund L, Ipsen H, Poulsen L. Safety and immunological changes during sublingual immunotherapy with standardized quality grass allergen tablets. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2006;16:162-168.

-
- 140 Mascarell L, Lombardi V, Louise A, Saint-Lu N, Chabre H, Moussu H, et al. Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:603-609.
- 141 Moingeon P, Batard T, Fadel R, Frati F, Sieber J, Van Overtvelt L. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy* 2006;61:151-165.
- 142 Bonvalet M, Moussu H, Wambre E, Ricarte C, Horiot S, Rimaniol AC, et al. Allergen-specific CD4+ T cell responses in peripheral blood do not predict the early onset of clinical efficacy during grass pollen sublingual immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2012;42:1745-1755.
- 143 Nieminen K, Laaksonen K, Savolainen J. Three-year follow-up study of allergen-induced in vitro cytokine and signalling lymphocytic activation molecule mRNA responses in peripheral blood mononuclear cells of allergic rhinitis patients undergoing specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;150:370-6.
- 144 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;120:707-13.
- 145 Piconi S, Trabattoni D, Rainone V, Borgonovo L, Passerini S, Rizzardini G, et al. Immunological effects of sublingual immunotherapy: clinical efficacy is associated with modulation of programmed cell death ligand 1, IL-10, and IgG4. *J Immunol* 2010;185:7724-30
- 146 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-10Foxp3(+) cells among CD25(+)CD4(+) leukocytes, is a potential therapeutic biomarker for sublingual immunotherapy: a preliminary report. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;153:378-87.
- 147 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;180:936-47.
- 148 Cox L, Compalati E, Kundig T, Larche M. New directions in immunotherapy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2013;13:178-195.
- 149 Jutel M, Akdis CA. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 2011; 66:726-32
- 150 Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008;323:211-5
- 151 Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 2008;63:1455-63.
- 152 Gri G, Piconese S, Frossi B, Manfroi V, Merluzzi S, Tripodo C, et al. CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity* 2008;29:771-81
- 153 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;120:218-224.

-
- 154 Savolainen J, Jacobsen L, Valovirta E. Sublingual immunotherapy in children modulates allergen-induced in vitro expression of cytokine mRNA in PBMC. *Allergy* 2006;61:1184-1190.
- 155 Novak N, Mete N, Busmann 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;130:1153-1158.
- 156 Van Overtvelt L, Lombardi V, Razafindratsita A, Saint-Lu N, Horiot S, Moussu H, et al. IL-10-inducing adjuvants enhance sublingual immunotherapy efficacy in a murine asthma model. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;145:152-162.
- 157 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;35:1773-1780
- 158 Passalacqua G, Albano M, Fregonese L, Riccio A, Pronzato C, Mela GS, et al. Randomised controlled trial of local allergoid immunotherapy on allergic inflammation in mite-induced rhinoconjunctivitis. *Lancet* 1998;351:629-632.
- 159 Petersen AB, Gudmann P, Milvang-Grønager P, Mørkeberg R, Bøgestrand S, Linneberg A, et al. Performance evaluation of a specific IgE assay developed for the Advia Centaur immunoassay system. *Clin Biochem* 2004; 37:882-92.
- 160 Antúnez 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;19:210-8
- 161 Jimeno Nogales L, Carreira J, Lombardero M. Obtention of monoclonal antibodies against human IgG4 using two different immunization strategies: development of a biotin-based ELISA for IgG4 quantitation. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990;92:175-82.
- 162 Wurtzen PA, Lund G, Lund K, Arvidsson M, Rak S, Ipsen H. A double-blind placebo-controlled birch allergy vaccination study II: correlation between inhibition of IgE binding, histamine release and facilitated allergen presentation. *Clin Exp Allergy* 2008;38:1290-301
- 163 Andersson K, Lidholm J. Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;130:87-107.
- 164 Suphioglu C. What are the important allergens in grass pollen that are linked to human allergic disease? *Clin Exp Allergy* 2000;30:1335-41.
- 165 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;203:1701-11.
- 166 Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009;30:899-911
- 167 Wang T, Li Y, Wang F, Zhou C. Nonadherence to sublingual immunotherapy in allergic rhinitis: a real-life analysis. *Int Forum Allergy Rhinol* 2017; 7: 389-392.

-
- 168 Holm J, Willumsen N, Würtzen PA, Christensen LH, Lund K. Facilitated antigen presentation and its inhibition by blocking IgG antibodies depends on IgE repertoire complexity. *J Allergy Clin Immunol* 2011;121:1029-37.
- 169 Jiménez-Saiz R, Chu DK, Mandur TS, Walker TD, Gordon ME, Chaudhary R, Koenig J, Saliba S, Galipeau HJ, Utley A, King IL, Lee K, Ettinger R, Wasserman S, Kolbeck R, Jordana M. Lifelong memory responses perpetuate humoral TH2 immunity and anaphylaxis in patients with food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Feb 16. pii: S0091-6749(17)30235-X. doi: 10.1016/j.jaci.2017.01.018
- 170 van Neerven RJ, Knol EF, Eijraes A, Würtzen PA. IgE-mediated allergen presentation and blocking antibodies: regulation of T-cell activation in allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;141:119-29.
- 171 Lund G, Willumsen N, Holm J, Christensen LH, Würtzen PA, Lund K. Antibody repertoire complexity and effector cell biology determined by assays for IgE-mediated basophil and T-cell activation. *J Immunol Methods*. 2012;383:4-20.
- 172 James LK, Bowen H, Calvert RA, Dodev TS, Shamji MH, Beavil AJ, et al. Allergen specificity of IgG(4)-expressing B cells in patients with grass pollen allergy undergoing immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130:663-70.
- 173 Aalberse RC, Stapel SO, Schuurman J, Rispens T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy* 2009;39:469-77.
- 174 van der Neut Kolschoten M, Schuurman J, Losen M, Bleeker WK, Martinez-Martinez P, Vermeulen E et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science* 2007;317:1554-57.
- 175 Aalberse RC. The role of IgG antibodies in allergy and immunotherapy. *Allergy* 2011;66 Suppl 95:28-30.
- 176 James LK, Shamji MH, Walker SM, Wilson DR, Wachholz PA, Francis JN, et al. Long-term tolerance after allergen immunotherapy is accompanied by selective persistence of blocking antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 2011;121:509-16.
- 177 Bufe A, Eberle P, Franke-Beckmann E, Funck J, Kimmig M, Klimek L, et al. Safety and efficacy in children of an SQ-standardized grass allergen tablet for sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123:167-73.
- 178 Wurtz O, Bajénoff M, Guerder S. IL-4-mediated inhibition of IFN-gamma production by CD4+ T cells proceeds by several developmentally regulated mechanisms. *Int Immunol* 2004;16:501-8.
- 179 Beal AM, Ramos-Hernández N, Riling CR, Nowelsky EA, Oliver PM. TGF- β induces the expression of the adaptor Ndfip1 to silence IL-4 production during iTreg cell differentiation. *Nat Immunol* 2011;13:77-85.
- 180 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;9:1347-55.
- 181 Hadjur S, Bruno L, Hertweck A, Cobb BS, Taylor B, Fisher AG, et al. IL4 blockade of inducible regulatory T cell differentiation: the role of Th2 cells, Gata3 and PU.1. *Immunol Lett* 2009;123:37-43.

- 182 Rosace D, Escribese MM, Fernandez P, Perez-Gordo M, Belver MT, Ramos T, Valls A, Dominguez MC, Vega A, Marco G, de Pedro M. Severe profilin mediated food reactions correlate with e oral mucosa integrity. *ALLERGY* 2016; 71: 161-161.
- 183 Scadding GW, Calderon MA, Shamji MH, Eifan AO, Penagos M, Dumitru F, Sever ML, Bahnon HT, Lawson K, Harris KM, Plough AG, Panza JL, Qin T, Lim N, Tchao NK, Togias A, Durham SR; Immune Tolerance Network GRASS Study Team. Effect of 2 Years of Treatment With Sublingual Grass Pollen Immunotherapy on Nasal Response to Allergen Challenge at 3 Years Among Patients With Moderate to Severe Seasonal Allergic Rhinitis: The GRASS Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2017; 14;317::615-625.