

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio prospectivo para la investigación de los cambios  
inmunológicos inducidos por distintas pautas de inmunoterapia  
subcutánea de un extracto depigmentado-polimerizado de gramíneas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Juan María Beitia Mazuecos**

Director

**Jerónimo Carnés Sánchez**

**Madrid, 2017**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I**



**Estudio prospectivo para la investigación de los cambios  
inmunológicos inducidos por distintas pautas de  
inmunoterapia subcutánea de un extracto depigmentado-  
polimerizado de gramíneas.**

**Doctorando: Juan María Beitia Mazuecos**

**MADRID, 2015**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I**



**Estudio prospectivo para la investigación de los cambios  
inmunológicos inducidos por distintas pautas de  
inmunoterapia subcutánea de un extracto depigmentado-  
polimerizado de gramíneas.**

**Juan María Beitia Mazuecos**

**Director de tesis: Dr. Jerónimo Carnés Sánchez**

**MADRID, 2015**



## **Informe Director de Tesis.**

La memoria del proyecto de tesis doctoral “Estudio prospectivo para la investigación de los cambios inmunológicos inducidos por distintas pautas de inmunoterapia subcutánea de un extracto depigmentado-polimerizado de gramíneas” que presenta y defenderá D. Juan María Beitia Mazuecos, tiene como objetivos principales:

- la determinación de perfiles de sensibilización alérgica IgE e IgG<sub>4</sub> de pacientes diagnosticados como alérgicos a *Phleum pratense*
- estudiar las modificaciones inmunológicas que se producen en estos pacientes, tras la administración de diferentes pautas de inmunoterapia (extracto despigmentado-polimerizado de gramíneas), condicionadas por el periodo estacional y el intervalo de administración
- y evaluar el perfil de seguridad de las diversas pautas.

La memoria muestra los resultados obtenidos en una población de 139 pacientes de la provincia de Guadalajara, encuadrados en cuatro grupos diferentes según la pauta de tratamiento y a los que se les realizó un estudio *in vitro*. Para ellos se realizaron dos extracciones de sangre periférica, una al inicio de la inmunoterapia y otra al finalizar el tratamiento.

Se realizó determinación de IgE e IgG<sub>4</sub> para Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5b, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 11 y Phl p 12 y se analizaron los niveles circulantes de IL4, IL5, IL10 e IFN $\gamma$  como marcadores del éxito de la inmunoterapia, antes y después del tratamiento. Finalmente se compararon estos resultados obtenidos, entre los diferentes grupos de estudio según se administrara la inmunoterapia dentro o fuera de la estación polínica y según las distintas pautas de administración más o menos agrupadas.

Los resultados del estudio mostraron una gran variedad en los perfiles inmunológicos de los pacientes, y cómo el tratamiento con la inmunoterapia fue capaz de cambiar los niveles de anticuerpos.

Parte de los resultados del estudio han sido publicados en revista del sector. **Beitia JM, López-Matas MA, Alonso A, Vega A, Mateo B, Cárdenas R, Carnés J.** *Allergenic profile to Phleum pratense and immunological changes induced after grass allergen-specific immunotherapy.* **Int Arch Allergy Immunol. 2014;165(1):9-17**

La memoria realizada por el doctorando se ha realizado bajo mi supervisión y en mi opinión reúne todos los criterios de calidad y originalidad para ser defendido como Tesis Doctoral.

VºBº Dr. Jerónimo Carnés Sánchez

*A mi esposa María Jesús, a mis hijos Javier, Alejandro y María, lo que  
más quiero en este mundo, gracias por hacerme sentir tan afortunado*



**Agradecimientos:**

Mi más afectuoso agradecimiento a mi director de tesis Dr Carnés, sin su apoyo, tiempo y dedicación este trabajo no podría haberse desarrollado.

A María Angeles siempre ahí cuando la necesité, y fue en muchas ocasiones, gracias por tu inmensa paciencia.

A mis compañeros del Hospital de Guadalajara: Dras Arantza, Ana, Belen y Remedios, DUE Ana e Isabel, a Mar y José sin vuestra ayuda no hubiese conseguido realizar este trabajo, gracias por vuestra comprensión en la vorágine de nuestro trabajo diario, habéis sido un apoyo imprescindible.

A los laboratorios LETI (gracias Elena) por abrirme vuestra casa y poner a mi disposición todos vuestros medios.



## Índice de abreviaturas y acrónimos.

μ	micras
μL	microlitros
μm	micrometros
°C	grados centígrados
%	tanto por ciento
cc	centímetros cúbicos
cm	centímetros
CCDs	carbohidratos de reactividad cruzada
CPA	células presentadoras de antígeno
EAACI	European Academy of Allergology and Clinical Immunology
GINA	Global Initiative for asthma
GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos
GRP	péptido relacionado con el gen de la calcitonina
HCl	ácido clorhídrico
IFN	interferón
IgA	inmunoglobulina A
IgE	inmunoglobulina E
IgG <sub>4</sub>	inmunoglobulina G <sub>4</sub>
IgG	inmunoglobulina G
IL	interleucina
ITA	inmunoterapia con alérgenos
ITSC	inmunoterapia subcutánea
ITSL	inmunoterapia sublingual
KCl	cloruro potásico

kDa	kilodalton
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	fosfato diácido de potasio
kU	kilounidades
l	litros
MAP	médico de atención primaria
mg	miligramos
ml	mililitros
mm	milímetros
$\text{mm}^3$	milímetros cúbicos
NaCl	cloruro sódico
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	bifosfato de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
nm	nanómetros
N.I	no inhibición
NS	no significativo
PBMC	célula mononuclear de sangre periférica
PCP	prueba cutánea positiva
pg	picogramos
rpm	revoluciones por minuto
TFN- $\beta$	factor de necrosis tumoral $\beta$
TGF	factor de crecimiento transformante
vs	versus
$\chi^2$	chi-cuadrado

## Índice figuras

Figura 1. . Producción de IgE tras la exposición antigénica

Figura 2. Fase inmunológica e inflamatoria de la reacción alérgica.

Figura 3. Funciones de las citocinas, quimiocinas y factores de transcripción en la inflamación nasal

Figura 4. Arco reflejo del estornudo.

Figura 5. *Dactylis glomerata*

Figura 6. Esquema que representa el intercambio de cadenas pesadas y ligeras que puede efectuar la IgG<sub>4</sub> cuando se encuentra frente a más de un antígeno al mismo tiempo.

Figura 7. Cambios inducidos por la inmunoterapia sobre la célula T reg.

Figura 8. Fórmula química del formaldehído.

Figura 9. Fórmula química del glutaraldehído.

Figura 10. Coeficientes de extinción en el pico principal de proteínas del espectro de absorción UV de una serie de extractos clásicos de alto peso molecular de polen alérgico.

Figura 11. Extracto total de proteínas alérgicas de alto peso molecular del polen de *Ambrosia elatior*.

Figura 12. Porcentaje de material liofilizado de alto peso molecular, de extractos de polen eliminado sustancias irrelevantes de bajo peso molecular adsorbidas a proteínas.

Figura 13. Histórico de niveles de polen de gramíneas en Guadalajara.

Figura 14. Perfil de sensibilización del grupo 1 en porcentaje.

Figura 15. Perfil de sensibilización del grupo 1 valor absoluto en kU/l.

Figura 16. Perfil de sensibilización del grupo 2 en porcentaje.

Figura 17. Perfil de sensibilización del grupo 2 valor absoluto en kU/l.

Figura 18. Perfil de sensibilización del grupo 3 en porcentaje.

Figura 19. Perfil de sensibilización del grupo 3 valor absoluto en kU/l.

Figura 20. Perfil de sensibilización del grupo 4 en porcentaje.

Figura 21. Perfil de sensibilización del grupo 4 valor absoluto en kU/l.

Figura 22. Comparativa de grupos intra y extraestacionales.

Figura 23. Comparativa de grupos semanal vs mensual.

Figura 24. Niveles de IgG<sub>4</sub> antes y después de inmunoterapia para los alérgenos individuales y para el extracto completo de *Phleum pratense* (Gg6).

Figura 25. Ratio IgE/IgG<sub>4</sub> antes y después de inmunoterapia en casos y controles. Se indican las diferencias significativas.

Figura 26. Porcentajes de pacientes sensibilizados a cada alérgeno de *Phleum pratense* y los valores absolutos de IgE específica (kU/l).

Figura 27. Perfiles de sensibilización a los alérgenos individuales de *Phleum pratense*.

Figura 28. Interleucinas grupo 1. Se representan uno a uno los valores de cada paciente. La línea roja marca la tendencia/media de cada interleucina en este grupo de tratamiento.

Figura 29. Interleucinas grupo 2. Se representan uno a uno los valores de cada paciente. La línea roja marca la tendencia/media de cada interleucina en este grupo de tratamiento.

Figura 30. Interleucinas grupo 3. Se representan uno a uno los valores de cada paciente. La línea roja marca la tendencia/media de cada interleucina en este grupo de tratamiento.

Figura 31. Interleucinas grupo 4. Se representan uno a uno los valores de cada paciente. La línea roja marca la tendencia/media de cada interleucina en este grupo de tratamiento.

Figura 32. IL-4 según periodo de administración. Se representan uno a uno los valores de cada paciente. La línea roja marca la tendencia/media de cada interleucina en este grupo de tratamiento.

Figura 33. IL-5 según periodo de administración. Se representan uno a uno los valores de cada paciente. La línea roja marca la tendencia/media de cada interleucina en este grupo de tratamiento.

Figura 34. IL-10 según periodo de administración. Se representan uno a uno los valores de cada paciente. La línea roja marca la tendencia/media de cada interleucina en este grupo de tratamiento.

Figura 35. IFN- $\gamma$  según periodo de administración. Se representan uno a uno los valores de cada paciente. La línea roja marca la tendencia/media de cada interleucina en este grupo de tratamiento.

Figura 36. Datos de interleucinas controles. Se representan uno a uno los valores de cada paciente. La línea roja marca la tendencia/media de cada interleucina en este grupo de tratamiento.

### **Índice de tablas.**

Tabla 1. Función, porcentaje de reconocimiento y peso molecular de los distintos grupos de alérgenos de gramíneas.

Tabla 2. Efectos clínicos e inmunológicos inducidos por la inmunoterapia.

Tabla 3. Pautas de administración de la inmunoterapia.

Tabla 4. Grupos de pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 5. Características generales, datos clínicos y sensibilización a neumoalérgenos de la población.

Tabla 6. Comparativa parámetros *in vitro* entre los grupos estudiados.

Tabla 7. Inhibición con Bromelina. Se muestra IgE específica para CCDs y Phl p 4.



## Índice general

<b>INFORME DIRECTOR DE TESIS</b> .....	5
<b>DEDICATORIA</b> .....	7
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	9
<b>ABREVIATURAS</b> .....	11
<b>INDICE FIGURAS Y TABLAS</b> .....	13
<b>INDICE GENERAL</b> .....	17
<b>RESUMEN TESIS DOCTORAL</b> .....	21
<b>PROJECT SUMMARY</b> .....	29
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	37
<b>1. ALERGIA</b> .....	39
1.1 Bases fisiopatológicas de la rinitis alérgicas.....	39
1.2 Rinitis y asma: una vía aérea común.....	45
<b>2. ALÉRGENOS</b> .....	46
2.1 Pólenes.....	48
2.1.1 Gramíneas.....	49
<b>3. INMUNOTERAPIA CON ALÉRGENOS</b> .....	53
3.1 Definición.....	54
3.2 Antecedentes.....	54
3.3 Mecanismo de acción.....	54
3.3.1 Cambios en los anticuerpos.....	55
3.3.2 Cambios en las células efectoras.....	56
3.3.3 Cambios en las células T.....	57
3.3.4 Factores que determinan la respuesta Th1 y/o Th2.....	59
3.4 Desarrollo de la inmunoterapia con alérgenos.....	61

3.4.1 Vacunas acuosas.....	61
3.4.2 Nuevas formas de inmunoterapia.....	61
3.4.2.1 Antecedentes.....	61
3.4.2.2 Alergoides.....	62
3.4.2.3 Mecanismo de acción de los alergoides.....	69
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....</b>	<b>73</b>
<b>1. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>75</b>
<b>2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....</b>	<b>76</b>
2.1 Objetivos principales.....	76
2.2 Objetivos secundarios.....	76
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>79</b>
<b>1. PACIENTES.....</b>	<b>81</b>
<b>2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....</b>	<b>81</b>
<b>3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....</b>	<b>81</b>
<b>4. GRUPOS DE PACIENTES.....</b>	<b>82</b>
<b>5. ABANDONOS DEL ESTUDIO.....</b>	<b>84</b>
<b>6. ESTACIÓN POLÍNICA.....</b>	<b>85</b>
<b>7. PRUEBAS CUTÁNEAS <i>in vivo</i> DE HIPERSENSIBILIDAD</b>	
<b>INMEDIATA.....</b>	<b>85</b>
<b>8. PRUEBAS <i>in vitro</i>.....</b>	<b>87</b>
8.1 Extracción sanguínea.....	87
8.2 Elaboración de extractos alergénicos.....	88
8.2.1 Extractos nativos de <i>Lolium peremne</i> , <i>Phragmites communis</i> , <i>Phleum pratense</i> y <i>Cynodon dactylon</i> .....	88
8.2.2 Extractos despigmentados de <i>Lolium peremne</i> , <i>Phragmites communis</i> , <i>Phleum pratense</i> y <i>Cynodon dactylon</i> .....	89

8.2.3 Extractos polimerizados de <i>Lolium perenne</i> , <i>Phragmites communis</i> , <i>Pleum pratense</i> y <i>Cynodon dactylon</i> .....	89
8.3 Estudio inmunológico realizado en los sueros de los pacientes.....	89
8.3.1 Determinación de la IgE específica.....	90
8.3.2 Determinación de la IgG <sub>4</sub> específica.....	90
8.3.3 Ensayo de ImmunoCAP inhibición.....	90
8.3.4 Determinación de los niveles de interleucinas (IL) en los sueros.....	91
<b>9. ADMINISTRACIÓN DE LA INMUNOTERAPIA.....</b>	<b>92</b>
<b>10. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA.....</b>	<b>93</b>
10.1 Índice descriptivos para la valoración de variables.....	93
10.1.1 Índices descriptivos para variables cuantitativas.....	93
10.1.1.1 Representaciones gráficas.....	93
10.1.1.2 Técnicas estadísticas para la comparación de variables.....	94
10.1.2 Variables categóricas.....	94
<b>IV. RESULTADOS. ....</b>	<b>95</b>
<b>1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS INDIVIDUOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO. ....</b>	<b>97</b>
<b>2. PRUEBAS CUTÁNEAS.....</b>	<b>98</b>
<b>3. ESTUDIO <i>IN VITRO</i> IgE ESPECÍFICA FRENTE A ALÉRGENOS DE <i>Pleum pratense</i>. ....</b>	<b>99</b>
3.1 Perfil de sensibilización por grupos.....	99
3.1.1 Grupo 1.....	99
3.1.2 Grupo 2.....	101
3.1.3 Grupo 3.....	101
3.1.4 Grupo 4.....	102
3.2 Comparativa parámetros <i>in vitro</i> entre los grupos estudiados.....	104

3.3 Comparativa de sensibilización entre los grupos intra y extraestacional....	106
3.4 Comparativa de sensibilización entre los grupos de administración de la inmunoterapia semanal vs mensual. ....	107
3.5 Resultados obtenidos en la población de estudio. ....	108
3.5.1 Respuesta IgG <sub>4</sub> e IgE antes y después de inmunoterapia en la población.	108
3.5.2 Perfil de sensibilización de la población.....	109
3.5.3 Inhibición de Phl p 4 con CCDs.....	111
<b>4 ESTUDIO <i>IN VITRO</i> CON INTERLEUCINAS</b> .....	112
4.1 Resultados de interleucinas por grupos. ....	113
4.1.1 Grupo 1.....	113
4.1.2 Grupo 2.....	114
4.1.3 Grupo 3.....	114
4.1.4 Grupo 4.....	115
4.2 Análisis de interleucinas intra y extraestacionales.....	116
4.2.1 IL4.....	116
4.2.2 IL5.....	117
4.2.3 IL10.....	118
4.2.4 IFN- $\gamma$ .....	118
4.2.5 Grupo control. ....	119
<b>5. SEGURIDAD EN LA ADMINISTRACIÓN DE INMUNOTERAPIA</b> .....	119
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	121
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	135
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> . ....	139
<b>VIII. ANEXO (PUBLICACIONES)</b> .....	157

# **RESUMEN TESIS DOCTORAL**



Estudio prospectivo para la investigación de los cambios inmunológicos inducidos por distintas pautas de inmunoterapia subcutánea de un extracto depigmentado-polimerizado de gramíneas.

## 1.- INTRODUCCIÓN.

La rinoconjuntivitis alérgica es un problema de salud mundial que afecta entre un 10 y un 25 % de la población. La alergia a polen de gramíneas es una de las causas de alergia respiratoria más frecuente en los países occidentales.

El tratamiento de la alergia está basado en tres principios fundamentales: la evitación del alérgeno, el tratamiento farmacológico sintomático y la inmunoterapia. Mientras que las dos primeras disminuyen la sintomatología, tan sólo la inmunoterapia con extractos alergénicos ha demostrado ser capaz de modificar la evolución natural de esta enfermedad.

La eficacia de la inmunoterapia específica en la reducción de síntomas alérgicos con diferentes alérgenos ha sido examinada y demostrada por numerosos ensayos clínicos, resumidos en metanálisis y revisadas en guías y artículos de opinión de diversas organizaciones científicas.

A pesar de la evidencia clínica, los mecanismos celulares y moleculares inducidos por la inmunoterapia están aun por esclarecer.

El diagnóstico molecular por componentes nos permite en el momento actual conocer la sensibilización de nuestros pacientes a las distintas alérgenos que pueden intervenir en su clínica.

Nos planteamos en este proyecto, evaluar el perfil de sensibilización molecular de una población de pacientes de Guadalajara (España) alérgica a gramíneas y las modificaciones inmunológicas que se producen con diferentes pautas de administración de inmunoterapia y en diferentes épocas del año.

## 2.- OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Principales.

- Determinación de los perfiles de sensibilización alérgica IgE e IgG4 de pacientes diagnosticados clínicamente como alérgicos a *Phleum pratense*. Estudio de sensibilización a los componentes moleculares Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5b, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 11 y Phl p 12.

- Estudio de modificación de los marcadores inmunológicos IgE e IgG4 tras la administración de diferentes pautas de inmunoterapia con extracto despigmentado polimerizado de *Phleum pratense*.
- Valorar si las modificaciones inmunológicas están condicionadas por el periodo estacional y/o el tiempo transcurrido hasta alcanzar una dosis acumulada de extracto alergénico administrado.
- Evaluar los niveles de mediadores inmunológicos IL4, IL5, IL10, IL12 e IFN $\gamma$  circulantes en suero, antes y después del tratamiento en diferentes pautas de administración.

## 2.2 Objetivos secundarios.

- Estudiar y evaluar el perfil de seguridad en diversas pautas de administración de la inmunoterapia.

## 3.- MATERIAL Y MÉTODOS

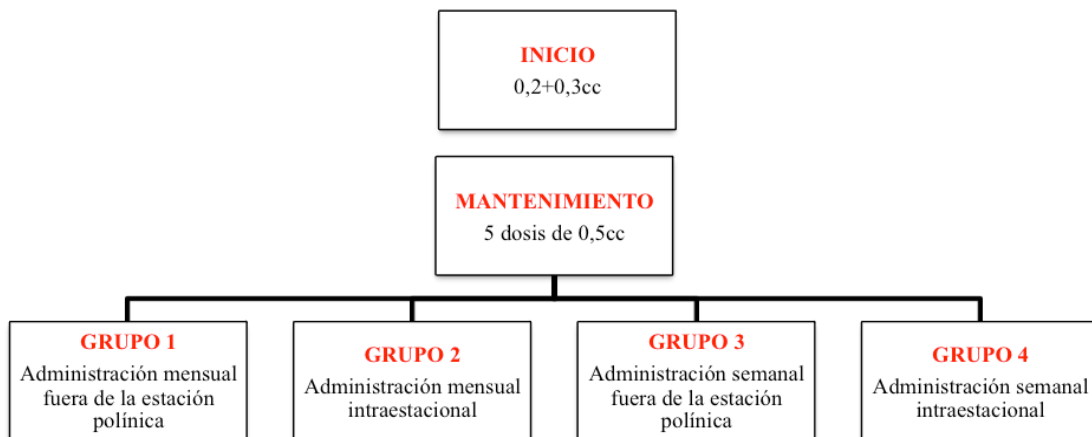
### 3.1 Grupos de pacientes.

Se trató de un estudio prospectivo abierto. Se reclutaron un total de 139 pacientes que cumplieran con todos los requisitos de inclusión que nos habíamos marcado con anterioridad.

Los pacientes fueron seleccionados por presentar patología respiratoria, ya sea en forma de rinoconjuntivitis o rinoconjuntivitis y asma bronquial extrínseca

Se indicó inmunoterapia para pólenes de gramíneas dentro del tratamiento global de su enfermedad en 103 pacientes que fueron separados en cuatro grupos en función del momento temporal en el cual acudían a nuestra consulta y se indicaba la inmunoterapia específica. En todos los grupos se incluyeron pacientes control que presentaban historia clínica de alergia a pólenes que no recibieron inmunoterapia específica.

A todos los grupos que recibieron tratamiento se les administró un extracto de pólenes de gramíneas 100% despigmentado-polimerizado (Depigoid ®, Laboratorios Leti S.L., Madrid, España) 0,2cc + 0,3cc con intervalos de 30 minutos en la pauta de iniciación. Tras concluir esta fase de iniciación, se administraron cinco dosis de 0,5 cc de mantenimiento, variando el intervalo del mismo según el grupo al que estuviera asignado el paciente.



### 3.2 Pruebas cutáneas in vivo de hipersensibilidad inmediata.

Se realizarán pruebas cutáneas en prick con extractos estandarizados (30 HEP/ml; Laboratorios LETI S.L.) para *Lolium perenne*, *Phragmites communis*, *Phleum pratense* y *Cynodon dactylon* a todos los pacientes por duplicado en ambos brazos.

### 3.3 Pruebas *in vitro*.

Para la realización del estudio *in vitro*, se hicieron dos extracciones de sangre periférica a todos los pacientes. La primera de ellas antes de iniciar el tratamiento con inmunoterapia y la segunda al finalizar dicho tratamiento, momento en que finaliza el estudio.

#### 3.3.1 Determinación de IgE específica.

Se midió la IgE específica de cada uno de los alérgenos individuales disponibles de *Phleum pratense*: Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5b, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 11 y Phl p 12 antes y después de inmunoterapia.

La presencia de IgE específica frente a glúcidos se determinó con MUXF3 (bromelina), mediante el immunoCAP.

#### 3.3.2 Determinación de la IgG4 específica.

Se midió la IgG4 específica para Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5b, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 11 y Phl p 12 antes y después de inmunoterapia y el ratio IgE/IgG4.

#### 3.3.3 Determinación de los niveles de interleucinas (IL) en los sueros.

Se analizaron IL4, IL5, IL10 e IFN $\gamma$  antes y después de la inmunoterapia.

### 3.4 Valoración de efectos adversos.

## 3. RESULTADOS.

Completaron el protocolo 122 pacientes, 97 del grupo activo (94,17%) y 25 del control (69,44%).

En la población general de este estudio, los alérgenos Phl p 1 y Phl p 4 han sido los más prevalentes, siendo reconocidos en el 96.4 y 91.2 % respectivamente.

Phl p 5b fue reconocido por el 68.2% de nuestros pacientes. Resulta significativo que el 15.3% de nuestros pacientes tengan IgE positivo para CCDs (carbohidratos).

Cuando hemos comparados los datos de sensibilización entre los grupos según su administración semanal vs mensual o según el periodo estacional administrado no hemos obtenido resultados estadísticamente significativos.

Los niveles de IgG<sub>4</sub> específica para *Phleum pratense* se incrementaron significativamente ( $p < 0.01$ ) después del tratamiento (de 0.3 a 1.6 mgA/l).

Observamos un aumento estadísticamente significativo en IgG<sub>4</sub> ( $p < 0.01$ ) para los alérgenos Phl p 1, 2, 4, 5b y 12. El ratio IgE/IgG<sub>4</sub> descendió significativamente para todos los alérgenos después de recibir la inmunoterapia, esto no se observó en los controles.

Los pacientes fueron clasificados según los alérgenos a los que estaban sensibilizados. Encontramos 25 perfiles distintos cuando consideramos todos los alérgenos y 15 perfiles cuando excluimos los alérgenos responsables de la reactividad cruzada (profilinas y polcalcinas) de nuestra clasificación.

En el estudio de interleucinas realizado obtuvimos una tendencia de descenso de IL4 e IL5 y de elevación de IL 10 e IFN- $\gamma$  concordante con la desviación Th2 a TH1 que hay descrita con el tratamiento con inmunoterapia, si bien estos resultados no alcanzaron la significación estadística.

Con respecto a la seguridad del tratamiento tuvimos tres reacciones adversas en el total de dosis administradas.

#### 4. CONCLUSIONES.

- 1.- La mayoría de nuestros pacientes están sensibilizados a Phl p 1 (96,4%) y a Phl p 4 (91,2%), seguidos por Phl p 5, Phl p 6 y Phl p 2.
- 2.- Phl p 4 es utilizado en el CAP como un alérgeno natural purificado, el resto son recombinantes (no glicosilados). El 75,9% de nuestros pacientes presentó una sensibilización a la fracción proteica de Phl p 4 lo que supone una proporción muy significativa en nuestra área geográfica (valoración clínica en estudio).
- 3.- Los valores de IgG<sub>4</sub> específica para todos los alérgenos de *Phleum pratense* se incrementaron en nuestros pacientes, siendo significativo para Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5b y Phl p 12. Igualmente el ratio IGE/IgG<sub>4</sub> descendió significativamente para todos los alérgenos después de la administración de inmunoterapia. Consideramos estos resultados como un posible marcador de eficacia.
- 4.- No se objetivaron diferencias significativas *in vitro* entre los grupos de estudio. Los resultados obtenidos nos llevan a pensar que la eficacia de la inmunoterapia a largo plazo no estaría relacionada con el tiempo más o menos agrupado de la administración sino con las dosis individuales y las concentraciones máximas que se pueden alcanzar .
- 5.- Los resultados obtenidos en las interleucinas muestran una tendencia de respuesta, con desviación del sistema Th2 hacia Th1, pero sin resultados significativos.
- 6.- Tratamiento seguro con un índice de reacciones adversas bajo independientemente del momento estacional o lo agrupado que administremos las dosis de inmunoterapia.



# **PROJECT SUMMARY**



Prospective study to investigate the immunological changes induced by different patterns of subcutaneous immunotherapy with depigmented polymerized grass extract.

## SUMMARY

### 1.- INTRODUCTION.

Allergic rhinoconjunctivitis is a worldwide health problem that affects between 10 and 25% of the population. Allergy to grass pollen is one of the most common causes of respiratory allergy in Western countries.

Allergy treatment is based on three fundamental principles: avoidance of the allergen, symptomatic drug therapy and immunotherapy. While the first two decrease the symptoms, only immunotherapy with allergen extracts has proven to be able to modify the natural history of this disease.

The efficacy of specific immunotherapy in reducing allergic symptoms with different allergens has been examined and demonstrated by numerous clinical trials, summarized in meta-analysis and reviewed in guides and opinion articles from various scientific organizations.

Despite the clinical evidence, the cellular and molecular mechanisms induced by immunotherapy are still to be clarified.

The molecular diagnosis by components allows us to know the current sensitivity of our patients to different allergens that may be involved in their symptoms.

In this project we propose to assess the molecular sensitivity profile of a patient population of Guadalajara (Spain) allergic to grasses and the immunological changes that occur with different patterns of administration of immunotherapy and in different seasons.

### 2.- OBJECTIVES

#### 2.1 Main Objectives.

- Determination of IgE and IgG4 allergen sensitization profiles of patients clinically diagnosed as allergic to *Phleum pratense*. Sensitization study to the molecular components Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5b, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 11 and Phl p 12.
- Study of modification of the immunological markers IgE and IgG4 after administration of different regimens of immunotherapy with depigmented polymerized extract of *Phleum pratense* (timothy grass).

- Assess whether the immunological changes are dependent on the seasonal period and/or the time to reach a cumulative dose of the administered allergen extract.
- Assess levels of immune mediators IL4, IL5, IL10, IL12 and IFN $\gamma$  circulating in serum before and after treatment in different dosage schedules.

## 2.2 Secondary objectives.

- Study and evaluate the safety profile in various administration regimens of immunotherapy.

## 3.- MATERIAL AND METHODS

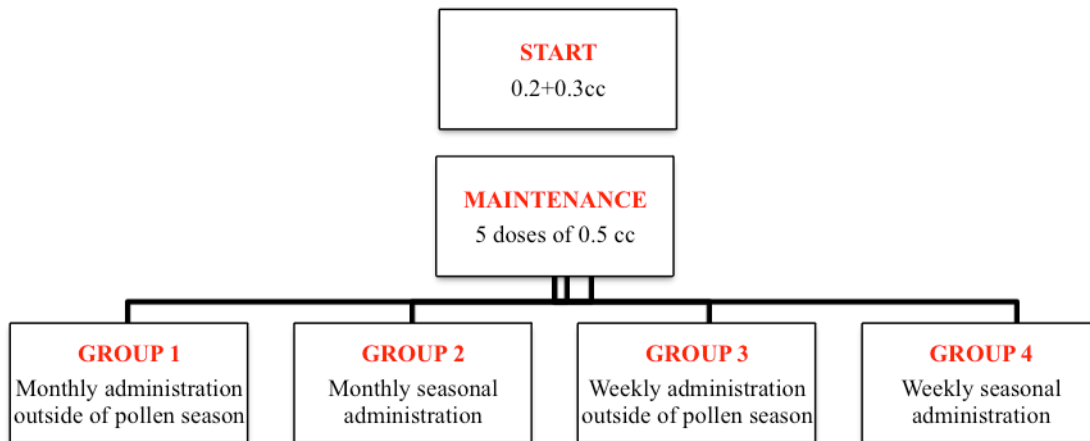
### 3.1 Patient groups.

This was an open-label prospective study. A total of 139 patients were recruited who met all inclusion criteria previously established.

Patients were selected for presenting respiratory disease, either in the form of rhinoconjunctivitis or extrinsic bronchial asthma and rhinoconjunctivitis.

Immunotherapy for grass pollens was indicated in the overall treatment of their disease in 103 patients who were divided into four groups depending on the time at which they came to our office and the specific immunotherapy indicated. All groups included control patients who had history of allergy to pollen but who did not receive specific immunotherapy.

All groups receiving treatment were given an extract of 100% depigmented-polymerized grass pollen (Depigoid®, Laboratorios Leti S.L., Madrid, Spain) 0.2 cc + 0.3cc with intervals of 30 minutes in the initiation phase. After concluding this initiation phase, patients received a maintenance dose of five doses of 0.5 cc, varying the interval according to the patient's assigned group.



### 3.2 In vivo skin tests of immediate hypersensitivity.

Skin prick tests were performed with standardized extracts (30 HEP/mL; Laboratorios LETI S.L.) for *Lolium perenne*, *Phragmites communis*, *Phleum pratense* and *Cynodon dactylon* in duplicate to all patients in both arms.

### 3.3 In vitro tests.

For the *in vitro* study all patients underwent two extractions of peripheral blood, the first one before starting treatment with immunotherapy and the second at the end of treatment when the study concluded.

#### 3.3.1 Measurement of specific IgE.

The specific IgE was measured for each of the available individual allergens of *Phleum pratense* (timothy grass): Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5b, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 11 and Phl p 12 before and after immunotherapy.

The presence of specific IgE to carbohydrate was determined with MUXF3 (bromelain), using immunoCAP.

#### 3.3.2 Measurement of specific IgG4.

Specific IgG4 was measured for Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5b, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 11 and Phl p 12 before and after immunotherapy, along with the IgE/IgG4 ratio.

#### 3.3.3 Measurement of serum levels of interleukins (IL).

IL4, IL5, IL10 and IFN $\gamma$  were analysed before and after immunotherapy.

### 3.4 Assessment of adverse effects.

## 3. RESULTS.

A total of 122 patients completed the protocol, 97 in the active group (94.17%) and 25 in the control group (69.44%).

In the general population of this study, the allergens Phl p 1 and Phl p 4 were the most prevalent, being recognized in 96.4 and 91.2% respectively.

Phl p 5b was recognized by 68.2% of our patients. Significantly, 15.3% of our patients have IgE positive for CCDs (carbohydrates).

When we compared the sensitization data among groups according to their weekly vs. monthly administration or according to season of administration we obtained no statistically significant results.

Levels of specific IgG<sub>4</sub> for *Phleum pratense* (timothy grass) increased significantly ( $p < 0.01$ ) after treatment (from 0.3 to 1.6 mgA/L).

We observed a statistically significant increase in IgG<sub>4</sub> ( $p < 0.01$ ) for allergens Phl p 1, 2, 4, 5b and 12. The IgE/IgG<sub>4</sub> ratio decreased significantly for all allergens after receiving immunotherapy, which was not observed in controls.

Patients were classified according to the allergens to which they were sensitized. We found 25 different profiles when we consider all allergens and 15 profiles when we excluded the allergens responsible for the cross-reactivity (profilin and polcalcin) of our classification.

In the study of interleukins we obtained a tendency to decrease in IL4 and IL5 increase in IL 10 and IFN- $\gamma$  consistent with the Th2 to Th1 deviation described in treatment with immunotherapy, although these results did not reach statistical significance.

With regard to the safety of the treatment we had three adverse reactions in the total administered doses.

#### 4. CONCLUSIONS.

- Most of our patients are sensitized to Phl p 1 (96.4%) and to Phl p 4 (91.2%), followed by Phl p 5, Phl p 6 and Phl p 2.

- A 75.9% of our patients showed allergenic sensitization to the glycosylated region of the protein Phl p 4. These results evidenced that a significant proportion of the patients in our area are recognizing CCD.

- The specific IgG<sub>4</sub> for all *Phleum pratense* (timothy grass) allergens increased in our patients, being significant for Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5b and Phl p 12. Likewise, the IGE/IgG<sub>4</sub> ratio decreased significantly for all allergens after administration of immunotherapy. We consider these results as a possible marker of efficacy.
- No significant differences between groups were observed. The results obtained suggest that the efficacy the long term immunotherapy would not be related with the time of administration but with the doses and the highest concentrations which could be reached.
- The results obtained with interleukins show a response tendency, with the Th2 to Th1 system deviation, but without significant results.
- The immunotherapy treatment administered is safe, regardless of seasonal administration.



# **I. INTRODUCCIÓN**



## **1. ALERGIA.**

La polinosis se define como la alergia respiratoria causada por los alérgenos contenidos en los granos del polen de las plantas. Es más frecuente con el polen de las plantas anemófilas, que realizan su polinización a través del lanzamiento y posterior dispersión del polen en el aire.

Las manifestaciones clínicas son fundamentalmente nasales y conjuntivales, pero pueden progresar a síntomas bronquiales, en un porcentaje variable según el tipo de polen y la naturaleza de la exposición.

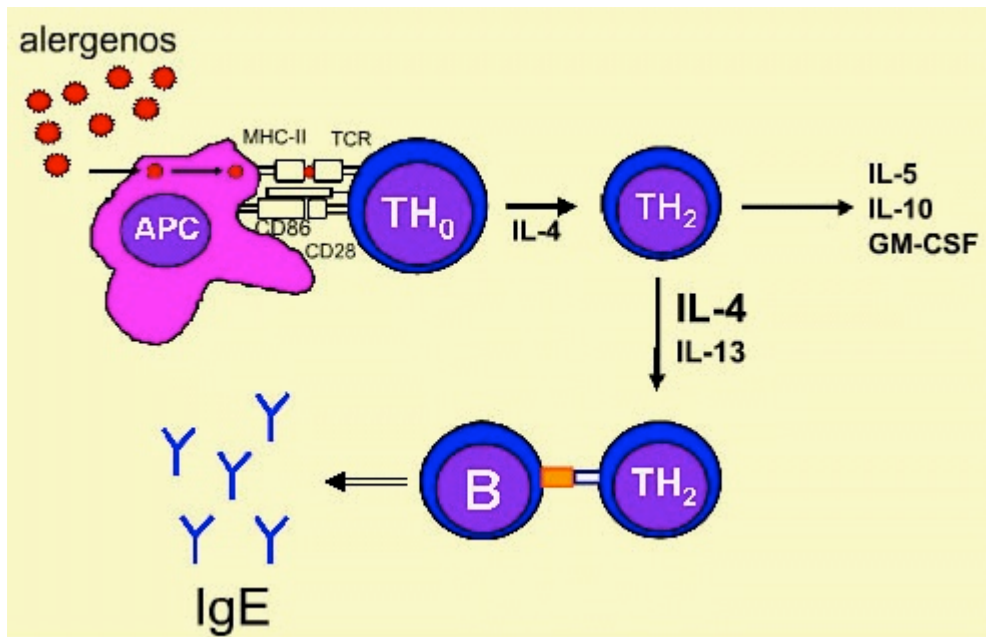
En los últimos años se ha puesto especial atención en la interrelación entre la nariz y los bronquios, llegando a la conclusión de que el asma y la rinitis son manifestaciones clínicas en diferentes órganos de un mismo proceso<sup>1</sup>.

### **1.1 BASES FISIOPATOLOGICAS DE LA RINITIS ALERGICA**

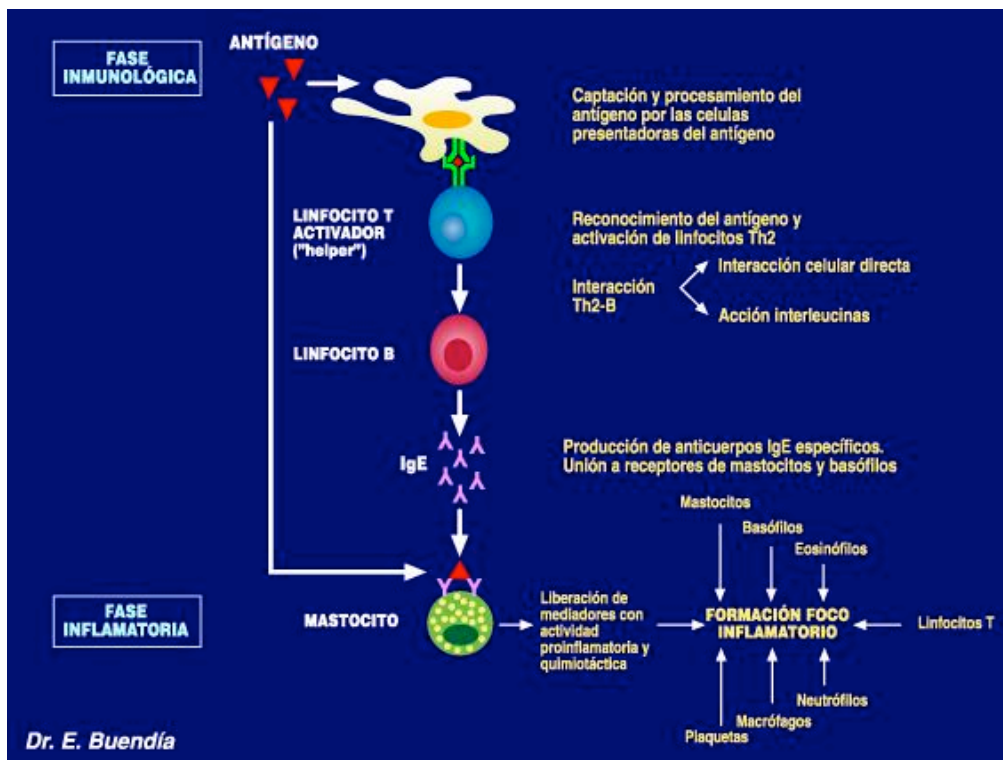
La rinitis alérgica es un proceso inflamatorio de la vía aérea alta caracterizada por prurito nasal, estornudos, rinorrea y obstrucción nasal. Los signos y síntomas que caracterizan a esta enfermedad son el resultado de una reacción de hipersensibilidad inmediata (tipo I) a diversos alérgenos.

En esta reacción de hipersensibilidad, mediada por IgE, tienen lugar una serie de acontecimientos. Inicialmente se produce una exposición al alérgeno; estos alérgenos, a través de células presentadoras de antígeno, interactúan con linfocitos T y B, para producir IgE (Figura 1).

A su vez anticuerpos IgE se unen a células con receptores de alta afinidad para IgE como los mastocitos y los basófilos, localizados en la superficie cutánea y en la periferia de las vénulas. Ante la reexposición al alérgeno, se produce una reacción que comprende una fase temprana mediada por mastocitos y otra tardía dependiente de células inflamatorias (Figura 2).



**Figura 1.** Producción de IgE tras la exposición antigénica.  
 Tratado de rinología. Mullol j, Montserrat JR (Ed. Laboratorio Astra-Zeneca 2001)



**Figura 2.** Fase inmunológica e inflamatoria de la reacción alérgica.  
 Atlas de Alergología. Buendía E, Cantó G. Serie Monografías. SEAIC

1.-En la fase temprana, el resultado de la interacción del antígeno con la IgE unida a la membrana de los mastocitos es la liberación de mediadores de la inflamación (histamina, triptasa, prostaglandinas, leucotrienos...) y citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$ ...) contenidos por estas células. Entre los mediadores destaca la histamina, que, actuando sobre los receptores H1, produce la triple respuesta de Lewis en los vasos (vasodilatación, eritema y edema), aumento de la secreción de las glándulas y prurito al estimular los receptores sensitivos, dando lugar todos estos hechos a la clínica de la rinitis.

2.-En la fase tardía (hasta 24h después del estímulo), hay una prolongación de los síntomas, predominando sobre el resto la congestión nasal. Se produce una infiltración del epitelio nasal por eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos T, que liberan leucotrienos, citocinas, histamina y otros mediadores. La parte más importante en la regulación de esta fase es probablemente la realizada por las citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF...) liberadas por mastocitos, linfocitos T y células epiteliales. Los eosinófilos tienen también una actividad citotóxica sobre las células epiteliales.

Las moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM y E-selectina) actúan como factores esenciales de la quimiotaxis y de la infiltración del epitelio nasal por células que normalmente están presentes en sangre.

A continuación vamos a intentar responder a las preguntas de por qué y cómo se producen los distintos síntomas que se asocian a esta patología:

- **Obstrucción nasal.**

La vía aérea nasal tiene una doble inervación, por un lado la colinérgica mediada por acetilcolina y por otro la adrenérgica mediada por noradrenalina.

Así las fibras colinérgicas liberan determinados elementos como la sustancia P y el VIP (péptido intestinal vasoactivo), que son los causantes de la vasodilatación aferente que estimula la secreción glandular por un estímulo directo. Y también las fibras

adrenérgicas que liberan neurocinina A y neuropéptidos, actuando sobre la secreción en forma de un estímulo indirecto. Las fibras periganglionares liberan GRPb U (bombesina), que también estimula la secreción nasal.

Los mediadores adrenérgicos actúan sobre los receptores alfa y beta de la mucosa nasal; los mediadores de la vía colinérgica lo hacen sobre los receptores muscarínicos (M1, M2, M3), nicotínicos y de la placa motora. Pero también existen una serie de mediadores, producidos por distintos tipos celulares, y que son considerados como los principales efectores de la reacción alérgica.

La histamina, el principal mediador desde el punto de vista cuantitativo, es liberada por los basófilos y mastocitos tras la estimulación inmunológica. Se sintetiza a partir de la histidina, y se cataboliza en intestino delgado, hígado, riñón y piel, siendo su acción principal la dilatación de vasos sanguíneos, por medio de receptores H1, sobre todo en los cornetes nasales. El edema producido en los mismos se debe en parte a la vasodilatación y en parte a la acción de la plasmaféresis, ya que al salir de los vasos sanguíneos el plasma se acumula en los tejidos blandos, sobre todo en los cornetes medio e inferior.

Los leucotrienos (derivados del ácido araquidónico), producen un aumento de la permeabilidad vascular y edema, con vasodilatación y producción de moco, participando en el reclutamiento de eosinófilos en la vía respiratoria. Potencian la acción de la histamina, siendo su efecto más tardío y prolongado.

Citoquinas proinflamatorias como la IL-10, TNF (factor de necrosis tumoral), IL-6 e IL-18 son potenciadoras inespecíficas de la inflamación, activando linfocitos T y B, induciendo la expresión de moléculas de adhesión y estimulando la secreción de citoquinas y quimiocinas. Existen una serie de citoquinas relacionadas con Th2, que participan en procesos como la regulación de la síntesis de IgE (IL-4 y IL-13) o actúan sobre la estirpe celular de los eosinófilos, a diferentes niveles (IL-3, IL-5 y GM-CSF).

En la figura 3 se pueden observar las distintas cininas que participan en el proceso inflamatorio de la rinitis.

Moléculas	Función principal
IL-3	proliferación / diferenciación de células progenitoras
IL-4	producción de TH2 e IgE, quimiotaxis de eosinófilos
IL-5	diferenciación, supervivencia y activación de los eosinófilos
IL-8	quimiotaxis de neutrófilos y eosinófilos
IL-10	inhibición de la función de linfocitos y eosinófilos
IL-13	síntesis de IgE / VCAM-1, inhibición de IFN- $\gamma$ / IL-12
IL-16	quimiotaxis de linfocitos CD4+
IFN- $\gamma$	inhibición de linfocitos TH2 y de la IgE
GM-CSF	supervivencia de eosinófilos, proliferación y diferenciación de células progenitoras
TNF- $\alpha$	quimiotaxis de los granulocitos
TGF- $\beta$	deposición de colágeno, inhibición de linfocitos T
Eotaxina	quimiotaxis de los eosinófilos
RANTES	quimiotaxis de los eosinófilos
AP-1 ( <i>fos + jun</i> )	producción de citocinas, tras-represión del receptor de corticoides
NF $\kappa$ B	producción de citocinas, tras-represión del receptor de corticoides
GATA-3	producción de IL-4 e IL-5

**Figura 3.** Funciones de las citoquinas, quimiocinas y factores de transcripción en la inflamación nasal Tratado de rinología. Mullol j, Montserrat JR(Ed. Laboratorio Astra-Zeneca 2001)

- **Secreción nasal**

La secreción nasal es consecuencia de dos mecanismos, por un lado el estímulo glandular directo y por otro la vasodilatación aferente. Está mediada por compuestos químicos como la histamina, que indudablemente tiene una acción glandular directa, y por otro a través de la vía nerviosa colinérgica, que produce también una respuesta contralateral al estímulo.

Los mediadores neurógenos, como la acetilcolina, son inductores de la secreción por acción glandular directa, y pueden inhibirse con el bromuro de ipratropio.

Los neuropéptidos, como la sustancia P, la neurocinina A, el GRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina) y el VIP, también producen estímulos glandulares directos, aumentando la secreción y por tanto la rinorrea.

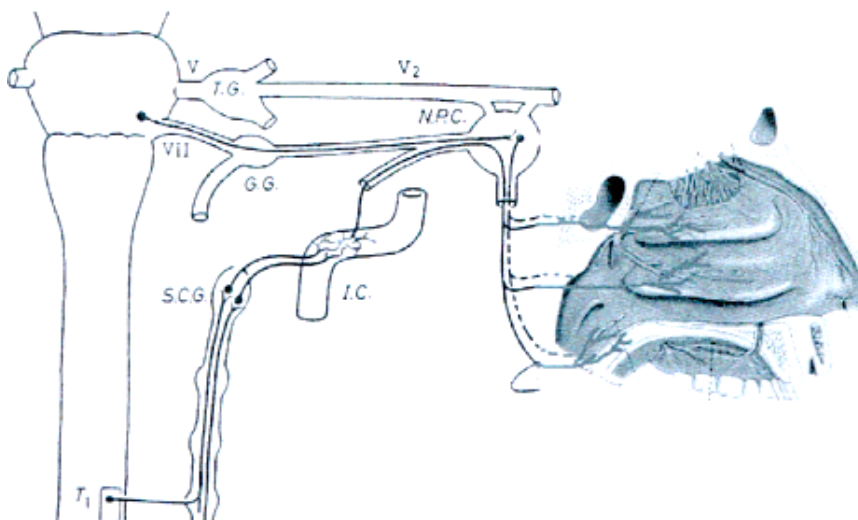
- **Prurito nasal**

El prurito no es sino el resultado de la estimulación de terminaciones sensitivas libres, que son fibras sin mielina, que pueden bloquearse con anestésicos tópicos.

Las sustancias químicas como la histamina o los neuropéptidos son capaces de estimular los tejidos tanto a través de un mecanismo directo por medio de las terminaciones nerviosas desmielinizadas como por un mecanismo indirecto de vasodilatación y plasmaféresis, produciendo una irritación que dará lugar al prurito.

- **Estornudos**

Se trata de un arco reflejo<sup>2</sup> que se inicia en los receptores epiteliales. La vía aferente seguiría a través del trigémino hacia los centros ponto-medulares, sobre todo en el suelo del cuarto ventrículo. De aquí saldría la vía eferente a través del nervio petroso superficial mayor, del esfenopalatino y del nervio frénico, para activar el diafragma al mismo tiempo que los músculos inspiratorios, las raíces torácicas y los músculos intercostales. (Figura 4)



**Figura 4.** Arco reflejo del estornudo.  
Tratado de rinología. Mullol J, Montserrat JR(Ed. Laboratorio Astra-Zeneca 2001)

Los mediadores de este reflejo serían la histamina y posiblemente también las cininas.

Por último vamos a referirnos a la presencia de eosinófilos en la secreción nasal, dato que nos permite realizar un diagnóstico diferencial entre los diferentes tipos de rinitis. Cualquier proceso inflamatorio generará la aparición de factores quimiotácticos cuya misión es atraer diferentes poblaciones celulares, entre las que se encuentran los eosinófilos. Conviene recordar que estos no son inocuos, sino que liberan proteínas intraeosinofílicas y provocan destrucción tisular.

Tras la provocación alérgica en individuos alérgicos sin síntomas, aumentan los recuentos de eosinófilos en lavados nasales de forma significativa comparando con sujetos no provocados y con la respuesta de sujetos no alérgicos provocados con antígeno.

## **1.2 RINITIS Y ASMA: UNA VÍA AÉREA COMÚN.**

La prevalencia de la rinitis alérgica en los países desarrollados está entre el 10% y el 20%, casi el triple de prevalencia que el asma bronquial<sup>3</sup>.

Es de reseñar que la gran mayoría de los pacientes asmáticos tienen rinitis, en algunos estudios lo cifran entre el 82% y el 95%<sup>4</sup>.

Gaga y cols<sup>5</sup> estudiaron la inflamación nasal en un pequeño grupo de pacientes con asma no atópica, que negaban tener rinitis, y encontraron que todos los pacientes presentaban inflamación de la mucosa nasal.

De igual manera se ha constatado en varios estudios la presencia de hiperreactividad bronquial asintomática en un alto porcentaje de niños con rinitis alérgica<sup>6</sup>.

Todo esto apoya la idea de que asma y rinitis podrían formar parte de un mismo proceso, con distintas manifestaciones y diferentes grados de severidad.

Debido a esto es fundamental cuando nos encontramos con pacientes con síntomas iniciales de rinitis indagar mediante la historia clínica posibles síntomas de afectación bronquial que pueden haber pasado desapercibidos para el paciente.

Igualmente no debemos olvidar, a la hora de realizar el tratamiento sintomático de esta enfermedad, tratar correctamente de forma conjunta tanto los síntomas nasales como los bronquiales. En la última revisión de la guía GINA<sup>7</sup> ( Global Initiative For Asthma) se reseña que en estudios poblacionales, el correcto tratamiento de la rinitis con corticoides nasales se asocia a una menor hospitalización y de visitas al servicio de urgencias en relación con el asma<sup>8</sup>.

Además el diagnóstico precoz de estos pacientes, hace que cuando se valora el tratamiento con inmunoterapia, hay estudios que demuestran que podría prevenir una polisensibilización cuando el paciente está monosensibilizado y de igual modo pudiera prevenir el comienzo de asma bronquial en los pacientes con rinitis<sup>9</sup>

## **2. ALÉRGENOS**

La mayoría de los alérgenos son proteínas o glicoproteínas con una masa molecular en el rango de los 5 a 100 kDa, y con puntos isoeléctricos ácidos que no se distinguen especialmente de otras moléculas proteicas. Sin embargo, existen una serie de características que pueden favorecer que una proteína o sustancia en general actúe como alérgeno, como son: capacidad para alcanzar el sistema inmune, complejidad molecular, concentración, solubilidad, extrañeza del organismo, estabilidad y características bioquímicas, entre otras. También pueden actuar como alérgenos, hidratos de carbono y componentes de bajo peso molecular que por su fuerte reactividad se conjugan con proteínas del huésped y actúan como haptenos. Los alérgenos también pueden aparecer como resultado de la interacción de un fármaco<sup>10</sup>.

La sensibilización a un alérgeno no solo depende de características intrínsecas a él, sino también de su presencia conjunta con factores ambientales como humo, polución o factores ligados a la inmunidad del individuo como predisposición genética, infecciones, inmunodepresiones debidas a patologías o tratamientos médicos,

situaciones de estrés, etc. Las fuentes más complejas de alérgenos son el polen, los hongos y los ácaros, de los que entre un 20% y un 60% de sus proteínas son alergénicas. Otros alérgenos menos complejos son epitelios de animales, orinas, etc.

Los alérgenos se definen como antígenos capaces de inducir una respuesta inmune mediada por inmunoglobulina E (Ig E). Hasta ahora el mejor método para determinar una sensibilidad alérgica, es la prueba cutánea y la determinación de IgE alérgeno específica en suero. Los alérgenos presentes en una fuente alergénica presentan dos características funcionales en base a su capacidad fijadora de IgE, que les permite su clasificación de relevantes, cuando su prevalencia es superior al 5% y mayoritarios, cuando su capacidad fijadora de IgE es superior al 50% o bien cuando inducen una prueba cutánea inmediata positiva en más del 90% de los pacientes sensibilizados a la fuente alergénica.

Los extractos alergénicos son obtenidos a partir de fuentes naturales o fuentes de sensibilización<sup>11</sup> y están formados por componentes de naturaleza proteica principalmente hidrosolubles y que dependiendo de sus estructuras, podrían presentar una reactividad cruzada con otras fuentes alergénicas, tal es el caso de las profilinas<sup>12</sup> y por tanto éste apartado debe ser cuidadosamente valorado en vía a conseguir diagnosticar la fuente de sensibilización primaria e idealmente el alérgeno causal.

En la década pasada se han desarrollado múltiples líneas de investigación, que han permitido disponer de las actuales bases de datos en las que se encuentran las principales características físico-químicas y funcionales de los alérgenos y al mismo tiempo, tras la elucidación de sus estructuras y las técnicas recombinantes, se ha conseguido describir los alérgenos con mayor relevancia clínica<sup>13</sup>, pero que en cualquier caso, los estudios deben de referir al alérgeno nativo las características que se muestren por parte de los alérgenos recombinantes.

La disponibilidad de alérgenos recombinantes ha permitido avances excepcionales en la investigación de los alérgenos presentes en las fuentes alérgicas y de éste modo se ha podido acelerar y describir en muchos casos cuales de los alérgenos presentes en un extracto alérgico son los implicados en las manifestaciones clínicas. La aplicación de los llamados “microarrays”, capaces de detectar un elevado número de posibles alérgenos causantes de alergia con cantidades muy pequeñas de material biológico es un claro ejemplo del futuro en la investigación clínica actual.

Nos referiremos a continuación a los pólenes, y fundamentalmente a las gramíneas objeto del presente estudio y principal causa de rinoconjuntivitis y asma bronquial en nuestro medio.

## **2.1 Pólenes**

Los pólenes se encuentran entre los alérgenos que primero se identificaron y constituyen una fuente importante de morbilidad alérgica en el ser humano. Su manifestación clínica clásica la constituyen los ataques de rinitis alérgica estacional tras la exposición a campos de heno en flor, por lo que este cuadro clínico fue denominado “fiebre de heno”.

Los granos de polen son estructuras indispensables para la reproducción de las plantas con semilla, al constituir el gameto masculino de las mismas. Los pólenes con relevancia alérgica corresponden a plantas adaptadas a un sistema de fecundación mediante transferencia aérea (anemogamia)<sup>14</sup>. Durante la polinización lanzan al aire miles de granos de polen, no adherentes y que flotan fácilmente por el aire. Éstos son partículas germinativas de un diámetro entre 20 y 80µm. Los alérgenos parecen tener una localización superficial, lo cual favorece su rápida extracción al contacto con la mucosa ocular o nasal.

Para que los pólenes tengan importancia clínica han de reunir tres características: tener tamaño suficientemente pequeño para permanecer suspendidos en el aire, encontrarse en

cantidades significativas en el área en cuestión y ser alergénicos, es decir, dotados de capacidad para inducir respuesta específica, mediada por anticuerpos IgE.

Los pólenes representan en Guadalajara la causa más frecuente de alergias respiratorias. Entre los pacientes que acuden a los centros de alergia en la región centro, la alergia a los pólenes es considerada la causa del 64% de la rinoconjuntivitis y el 52% del asma<sup>15</sup>. La gran importancia alergológica de los pólenes en nuestra zona geográfica, en especial en áreas urbanas, puede obedecer en parte a la combinación de un nivel alto de polución atmosférica junto con amplios espacios verdes, que durante los años húmedos da lugar a concentraciones atmosféricas de pólenes de gramíneas muy altas, equiparables a los encontrados en la Europa húmeda del Norte<sup>16,17</sup>.

El clima de la zona centro de España es de tipo Mediterráneo contrastado (continental extremo), caracterizado por veranos calurosos, largos y secos con inviernos fríos y con precipitaciones escasas, y en general abundantes en otoño y primavera, aunque con grandes fluctuaciones interanuales, que condicionan a su vez importantes variaciones en las concentraciones anuales de pólenes<sup>18,19</sup>.

En un estudio realizado por Subiza y colaboradores<sup>20</sup>, se analizaron cuales eran los pólenes que producían polinosis en los pacientes polínicos de Madrid. La mayoría de los pacientes polínicos de Madrid experimentaban su sintomatología durante los meses de mayo y junio. Durante ese periodo los tipos de pólenes clínicamente importantes (con prueba cutánea positiva (PCP)), mas frecuentemente recolectados en la atmósfera de Madrid eran las gramíneas (94%) seguidas de *Olea europaea* (61%). Así mismo, se demostró que las gramíneas que daban lugar a más PCP entre los pacientes con polinosis durante los meses de Mayo a Junio en Madrid fueron de la especie *Dactylis glomerata* (87%) y *Trisetum paniceum* (85%). Estos datos son extrapolables a la zona de Guadalajara donde realizamos el presente estudio.

### **2.1.1 Gramíneas.**

Dentro de las gramíneas, se han descrito más de 650 géneros distintos y alrededor de 12.000 especies, constituyendo el 20% de la masa vegetal de nuestro planeta:

- La subfamilia *Pooideae* incluye a la mayor parte de los géneros más importantes causantes de polinosis: *Alopecurus*, *Agrostis*, *Anthoxanthum*, *Dactylis*, *Festuca*, *Holcus*, *Lolium*, *Phleum*, *Poa* y *Trisetum*.
- En España, del género *Phleum* hay 6 especies, siendo las más comunes *Phleum pratense* y *Phleum phleoides*. Existe una especie de *Dactylis*, 5 de *Lolium*, 7 de *Trisetum*, 33 de *Poa* y hasta 60 de *Festuca*<sup>21</sup>.

Sin embargo, entre ellos existe una importante reactividad cruzada, por lo que con la determinación de una o dos especies de gramíneas suele ser suficiente para el diagnóstico in vitro de la alergia al polen de gramíneas<sup>22</sup>.

Las plantas de la Familia *Poaceae* (Gramíneas) son la mayor causa de polinosis en todo el mundo y en particular en nuestro país. Son por ello, posiblemente, las fuentes de alérgenos más estudiadas. Son plantas prácticamente cosmopolitas y con pocos requerimientos de crecimiento, lo que favorece el gran número de sensibilizaciones de las que son responsables. Su ciclo vital, que depende de la temperatura y la humedad, se completa en unos pocos meses. La máxima eclosión de estas plantas ocurre durante los meses de mayo y junio, prolongándose sus efectos hasta julio e incluso agosto, dependiendo de las condiciones climáticas. El tiempo climático es determinante cuando se habla de los niveles del polen en el ambiente y el viento favorece enormemente su dispersión y distribución.

Numerosas especies con capacidad alérgica están encuadradas en el grupo de las Gramíneas, donde numerosos alérgenos han sido descritos, secuenciados y clonados en los últimos años.<sup>23,24</sup>

*Dactylis glomerata* (dáctilo) es la única especie que pertenece al género *Dactylis*. Es muy común y está ampliamente repartida por la Península y Baleares (Figura 5).



**Figura 5.** *Dactylis glomerata*

Debido a la proximidad taxonómica que presentan todas las Gramíneas existe un elevado grado de reactividad cruzada entre ellas, lo que posiblemente las haga más sensibilizantes. Además, varias especies suelen crecer en el mismo área lo que implica una polisensibilización. La reactividad cruzada interespecie e intraespecie ha sido demostrada en muchas ocasiones con el empleo de alérgenos recombinantes y anticuerpos monoclonales<sup>25</sup>.

Los alérgenos de Gramíneas han sido clasificados en diferentes grupos atendiendo a sus características biológicas. Todos ellos presentan una gran homología y tienen un alto grado de reactividad cruzada.

Hasta la fecha, se han identificado y caracterizado hasta 11 proteínas alérgicas en una o más de estas especies (Tabla 1)

	PM (kDa)	Función	Frecuencia de Sensibilización
<b>Grupo 1</b>	31-35	B-expansina  (liberación fibras de celulosa)	90%
<b>Grupo 2 y 3</b>	10-12	Homología con Grupo 1	40-60%
<b>Grupo 4</b>	50-67	10% su PM carbohidratos	80%
<b>Grupo 5</b>	27-33	?	60-85%
<b>Grupo 6</b>	13	?	60-70%
<b>Grupo 7</b>	8,6	Polcalcina	10%
<b>Grupo 10</b>	12	Citocromo C	<5%
<b>Grupo 11</b>	18	Inhibidor de tripsina	66%
<b>Grupo 12</b>	12-15	Profilina	20%
<b>Grupo 13</b>	55	Poligalacturonasa  (recambio y remodelado pared celular)	50%

**Tabla 1** . Función, porcentaje de reconocimiento y peso molecular de los distintos grupos de alérgenos de gramíneas (obtenido de allergome.org).

Estos grupos están constituidos por proteínas glicosiladas y no glicosiladas, de diferentes tamaños, estructuras y características fisicoquímicas:

- Grupo 1: Alérgenos mayoritarios. Prevalencia del 90% en los pacientes alérgicos. Es uno de los grupos más frecuente y ha sido descrito en la mayoría de las Gramíneas con capacidad alérgica. Esta formado por glicoproteínas ácidas con un peso molecular desde 27 kDa del *Phleum pratense* (Phl p 1) o *Lolium perenne* (Lol p 1) hasta 32 kDa de *Dactylis glomerata* o *Cynodon dactylon*. Su función es la liberación de las fibras de celulosa para permitir la expansión y crecimiento celular.

- Grupos 2 y 3: Alérgenos minoritarios. Presentan alto grado de homología con alérgenos del grupo 1.
- Grupo 4: Alérgeno mayor. El 10-15% de su estructura la forman glúcidos.
- Grupo 5: Alérgeno mayor. Se ha encontrado una prevalencia de sensibilización del 65 al 85%. Su función biológica es aún desconocida. Para el Phl p 5 hay descritas 16 isoformas; la conocida como “a” es el Phl p 5.01102 y Phl p 5.01109 y la “b” Phl p 5.0201. El peso molecular de estos alérgenos es de aproximadamente 31 kDa.
- Grupo 6: Alérgeno mayor. Se ha identificado únicamente en los géneros de *Phleum pratense* y *Poa pratensis*.
- Grupo 7: Alérgeno menor. Reconocido casi el 10% de los sujetos alérgicos. Se trata de una proteína ácida con dos dominios fijadores de calcio, por lo que se denomina polcalcina. Se considera un panalérgeno, puesto que se encuentra presente en el reino animal y vegetal, aunque en este último es exclusivo de los pólenes. *Cynodon d 7* y *Phleum p 7* han sido comercializados como alérgenos recombinantes.
- Grupo 10: Alérgeno menor. Constituido por el Citocromo C, una glicoproteína ácida de 12 kDa.
- Grupo 11: Alérgeno mayor. Representado por una glicoproteína, relacionado con *Ole e 1*, que es un inhibidor de la tripsina de soja.
- Grupo 12: Alérgeno menor. Pertenecientes a las profilinas; La profilina es una proteína de 12 a 15 kDa presente en todas las células eucariotas, y muy conservada a lo largo de la evolución, lo que la convierte en un panalérgeno. Tiene un papel estructural, formando complejos con la actina, regula su polimerización, y participa en la forma y movimientos celulares y en la germinación de los pólenes.
- Grupo 13: Alérgeno menor. Es el grupo más recientemente identificado. Pertenecen a la familia de las poligalacturonasas.

### **3. INMUNOTERAPIA CON ALERGENOS**

### **3.1. Definición**

La inmunoterapia (IT), con alérgenos ha consistido tradicionalmente en administrar cantidades gradualmente crecientes de un extracto alérgico a un sujeto alérgico para mejorar la sintomatología causada por la exposición posterior al alérgeno causante <sup>26</sup>.

### **3.2. Antecedentes**

La inmunoterapia específica frente alérgenos para el tratamiento de una reacción de hipersensibilidad tipo I, fue descrita por primera vez por Curtis<sup>27</sup>, pero su introducción siempre se achaca a Noon y Freeman<sup>28</sup>. Ambos autores emplearon en 1911 la inmunoterapia como un método para proteger a los pacientes del “polen tóxico”.

En 1921 Prausnitz y Kuestner<sup>29</sup>, usando la transferencia pasiva (el P-K test), demostraron que los individuos alérgicos tenían en el suero antígenos específicos ó reaginas.

En 1935 Cooke y colaboradores<sup>30</sup>, establecieron que había dos formas de anticuerpos frente al polen y que la inmunoterapia podía incrementar anticuerpos “bloqueantes”.

Casi 30 años después, Ishizaka y colaboradores<sup>31</sup>, identificaron el agente reagínico como IgE, desde entonces se han esclarecido muchos detalles sobre la respuesta inmunológica frente alérgenos.

### **3.3. Mecanismos de acción**

La fisiopatología de la respuesta inmune alérgica es compleja y está influenciada por varios factores como la susceptibilidad genética, vía de exposición, la dosis y las características estructurales del alérgeno. El estudio de los mecanismos de acción de la inmunoterapia específica es, de la misma manera, complejo. De una forma simplificada podría decirse que la inmunoterapia induce cambios en tres niveles: anticuerpos, células efectoras y células T, niveles relacionados entre sí.

La inmunoterapia subcutánea (ITSC) aporta las mayores evidencias, actualmente disponibles sobre los mecanismos de acción de la ITA, existiendo menos evidencias de

como funciona la inmunoterapia sublingual (ITSL) pero algunos estudios sugieren que existen paralelismos en ambos tipos de ITA, con la inducción de células reguladoras<sup>32</sup>. Respecto a este tipo de ITA se han realizado ensayos con alérgenos marcados con isótopos radioactivos cuyos resultados sugieren que los alérgenos son procesados por células dendríticas presentes en la mucosa oral<sup>33</sup>.

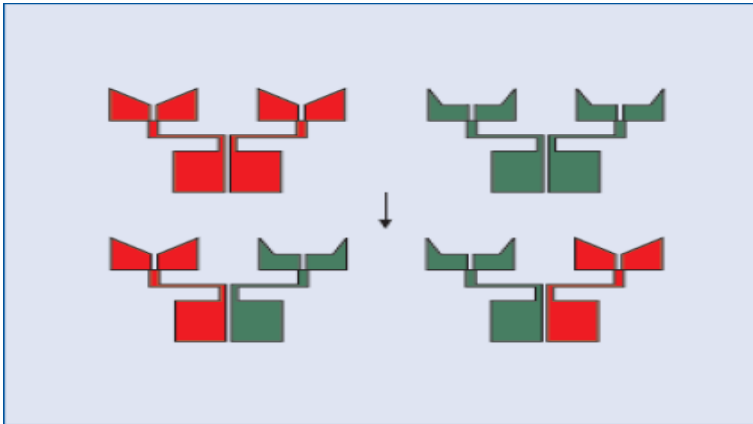
### **3.3.1 Cambios en los anticuerpos**

A los 6 meses del inicio de la inmunoterapia específica se puede objetivar un descenso significativo de los niveles de IgE específica que se acompañan de una reducción en el tamaño de la pápula de la prueba cutánea (que equivaldría a una disminución de la sensibilización alérgica) y un aumento de anticuerpos de tipo IgG (especialmente a expensas de IgG<sub>4</sub>) e IgA. De todo ello, ha sido el aumento de la IgG<sub>4</sub> al que se le ha dado una mayor relevancia.

La IgG<sub>4</sub> específica actuaría como anticuerpo con función bloqueante sobre la IgE de dos posibles formas:

- Agregación de los receptores FcγRIIb (para la IgG) con los receptores FcεRI (para la IgE) que tendría como consecuencia su inhibición funcional.
- Inhibición de la presentación del antígeno facilitada por IgE<sup>30</sup>.

Sin embargo, y en contra de lo que cabría esperar, el aumento de la IgG<sub>4</sub> no va paralelo a la mejoría clínica. Esto podría ser debido, de un lado, a un problema de medición (la IgG<sub>4</sub> específica que se mide no va dirigida frente a las mismas moléculas que la IgE) o a un problema de funcionalismo (la IgG<sub>4</sub> no es monoespecífica y sus cadenas ligeras y pesadas se pueden separar y combinar dando lugar a anticuerpos bifuncionales que pueden no estar dirigidos frente a los mismos epítomos que la IgE y por ello no ejercen efecto bloqueante) como se ilustra en la figura 6.



**Figura 6.** Esquema que representa el intercambio de cadenas pesadas y ligeras que puede efectuar la IgG4 cuando se encuentra frente a más de un antígeno al mismo tiempo (Tomada de Aalbersen y Schuurman)

La teoría de los anticuerpos bloqueantes ha experimentado un claro resurgimiento cuando ha empezado a entenderse la enfermedad alérgica como una respuesta a proteínas individualizadas y no a materiales biológicos completos<sup>34, 35</sup>

En la ITSL se produce un incremento en los niveles de IgG<sub>4</sub> frente al alérgeno comparado con placebo<sup>36</sup> con un muy limitado impacto sobre la respuesta IgE

### 3.3.2 Cambios en las células efectoras

La inmunoterapia actúa sobre las células efectoras tanto de la respuesta inmediata como tardía inhibiendo la liberación de mediadores y la respuesta inflamatoria aguda y crónica tras la exposición al alérgeno.

Respecto a la respuesta inmediata, es posible que la inmunoterapia induzca desde el principio un aumento del umbral para la liberación de mediadores por mastocitos y basófilos y, aunque desconocemos el modo en que ocurre, los receptores para estos mediadores en los órganos diana podrían sufrir cambios que los situara en estado parcialmente refractario, precisándose una mayor cantidad de mediadores para producir reacciones clínicas<sup>37</sup>. La posibilidad de estudiar la activación de basófilos mediante marcadores como CD63 y CD203 o CD-sens apoya el efecto de la inmunoterapia sobre este grupo celular<sup>38</sup>.

Por su parte, y en relación a la respuesta tardía, se sabe que la inmunoterapia actúa sobre eosinófilos, neutrófilos, basófilos y células T activadas, responsables todos ellos de la respuesta inflamatoria persistente, tanto de forma directa, inhibiendo la migración celular al foco tras la exposición alérgica como indirectamente, a través de una inhibición de los mediadores proinflamatorios <sup>39</sup>.

En lo que respecta a la ITSL se ha observado una reducción significativa de los neutrófilos, los eosinófilos y las moléculas de adhesión ICAM-1 tras el tratamiento, lo cual se pone de manifiesto tras pruebas de provocación específica de antígeno, y que demuestra una disminución en la respuesta inflamatoria dependiente del alérgeno por efecto de la ITSL <sup>40</sup>.

### **3.3.3 Cambios en las células T**

El conocimiento de las células T y sus comportamientos ha experimentado un crecimiento muy notable en el último tercio del siglo XX.

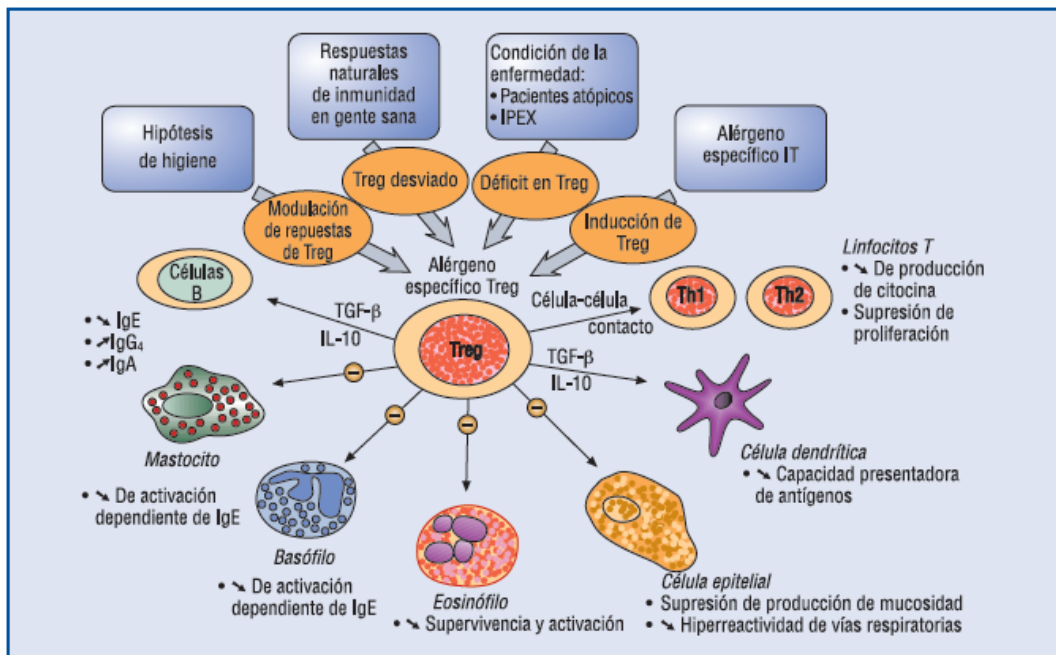
- Ha sido demostrado que el éxito de la inmunoterapia está relacionado con un cambio fenotípico Th2→Th1, estando en la intimidad de este fenómeno la apoptosis de células T CD4<sup>+</sup> <sup>41</sup>. La principal consecuencia funcional de este fenómeno es la reducción en los niveles de productos Th2: IL-4, IL-13, IL-5 e IL-9 tanto a nivel periférico como en los órganos diana, y aumento de los niveles de IFN- $\gamma$  como expresión de Th1.
- También se tiene evidencia de la importancia de los clones celulares Treg, (Figura 7) caracterizados por la expresión fenotípica CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup>, capaces de ejercer un control sobre las funciones indeseadas de las células Th2 a través de múltiples acciones <sup>42</sup>. Los efectos de estas células son múltiples, destacando la aparición de IL-10 (promueve una desviación Th2 a Th1 y como consecuencia se produce un cambio IgE→IgG<sub>4</sub>) y de TGF- $\beta$

(aumenta la producción de IgA) y la acción directa de las T reg sobre las Th2 suprimiendo su respuesta.

- En los últimos años se ha descrito el posible papel de nuevas poblaciones de células T como las células Th17 o las células Th9 pero el efecto de la inmunoterapia específica sobre ellas no está totalmente dilucidado<sup>43,44</sup>.

En lo concerniente a la ITSL, durante la inmunoterapia se produce un incremento de estas células Treg con una producción de TGF- $\beta$ , IL-10, citocinas que controlan la respuesta inflamatoria, produciéndose una hiporrespuesta antígeno-específica. Sólo muy recientemente hemos comenzado a tener evidencia de como la ITSL es capaz de inducir la aparición de linfocitos Treg<sup>45</sup>. Los mismos autores demostraron también la presencia en los nódulos linfáticos cervicales de Linfocitos T productores de IL-10.

En la Tabla 2 se muestran resumidos los efectos clínicos e inmunológicos de la inmunoterapia subcutánea.



**Figura 7.** Cambios inducidos por la inmunoterapia sobre la célula T reg. (Tomado de Inmunoterapia con alérgenos en el tratamiento de las enfermedades alérgicas- Comité de inmunoterapia de la SEAIC 2010)

<b>Parámetros clínicos</b>
Eficacia a largo plazo
Disminución de síntomas y necesidad de tratamiento farmacológico
Disminución de la respuesta en provocación con alérgeno
Disminución del tamaño y respuesta celular en la respuesta tardía
Mejoría de la calidad de vida
<b>Mastocitos</b>
Disminución de la infiltración tisular
Disminución de la liberación de inhibidores
Disminución de la producción de citocinas proinflamatorias
<b>Basófilos</b>
Disminución de la liberación de mediadores
Disminución de la liberación de citocinas proinflamatorias
<b>Eosinófilos</b>
Disminución de la infiltración tisular
Disminución en la liberación de mediadores
<b>Linfocitos T</b>
Disminución de la proliferación inducida por el alérgeno
Inducción de Linfocitos Treg
Aumento de la secreción de IL-10 y TGF $\beta$
Supresión de linfocitos Th2 y citocinas
Disminución del número de células T en la respuesta tardía
<b>Linfocitos B</b>
Elevación precoz y disminución tardía en la IgE sérica específica
Aumento de los niveles de IgG4 específicos
Aumento de los niveles de IgG1 específica (menor)
Aumento de los niveles de IgA específica
Supresión de la presentación antigénica facilitada por la IgE específica
<b>Células dendríticas</b>
Según el coadyuvante se afectan distintos subtipos
Supresión de la presentación facilitada por la IgE específica
<b>Monocitos</b>
Aumento de los niveles de IL-10

**Tabla 2.** Efectos clínicos e inmunológicos inducidos por la inmunoterapia. (Tomado de Inmunoterapia con alérgenos en el tratamiento de las enfermedades alérgicas- Comité de inmunoterapia de la SEAIC 2010)

### 3.3.4 Factores que determinan la respuesta Th1 y/o Th2

La respuesta del sistema inmune es frente a un antígeno, por lo que el origen de la relación Th1/Th2 hay que buscarlo en las características físico-químicas de la proteína. Éstas proteínas, no reconocidas como propias, desencadenan una reacción, por lo que el tamaño, la dosis de alérgeno, vía de entrada e incluso la naturaleza de la CPA (célula presentadora de antígeno), condicionan las interacciones entre el antígeno y el sistema inmunitario.

Las circunstancias del huésped (determinismo genético, estado nutricional, edad, presencia de infecciones, tratamientos farmacológicos concomitantes, etc.), producen variaciones en las respuestas inmunes de unos individuos a otros.

**-CPA:** La presentación de alérgenos a bajas dosis por las células B o las células dendríticas favorece la respuesta Th2, mientras que el procesamiento y presentación de alérgenos a altas dosis por los macrófagos favorece la respuesta Th1.

**-Tamaño:** El tamaño molecular del antígeno es crítico en la forma en que será procesado por las células del sistema inmunológico, y como consecuencia, el tipo de respuesta inmunitaria que desencadenará. Los antígenos de bajo peso molecular son endocitados por linfocitos B, que los presenta a linfocitos T, originando una respuesta predominante de tipo Th2. Los antígenos grandes, como los extractos polimerizados con glutaraldehído, no pueden ser endocitados por linfocitos B, pero pueden ser fijados por inmunoglobulinas de membrana del linfocito B que son específicas para alguno de sus determinantes, y de esta forma puede ser fagocitado por el macrófago y presentado al linfocito T, induciendo una respuesta inmune predominantemente de tipo Th1.

Los productos de alto peso molecular pueden ser particularmente atractivos para ciertas células presentadoras de antígenos<sup>46</sup>, como son macrófagos y por lo tanto ser presentados de una forma específica al sistema inmune. Se ha demostrado que los alérgenos modificados con glutaraldehído son capaces de modificar la producción de citoquinas favoreciendo la producción de IFN- $\gamma$ , con el subsiguiente cambio en el balance de actividad Th1-Th2 hacia una respuesta de tipo Th1 con una disminución de la producción de anticuerpos IgE<sup>47,48,49</sup>

A pesar de la sofisticada comprensión que tenemos de la respuesta inmunológica, no se conocen todavía cuales de los cambios que induce la inmunoterapia convencional son responsables de la mejoría sintomática de los pacientes. Igualmente no se pueden hacer

afirmaciones dogmáticas sobre qué aspectos de la respuesta inmunológica debe ser nuestro principal objetivo a cambiar.

### **3.4. Desarrollo de la IT con alérgenos**

#### **3.4.1. Vacunas acuosas**

Son extractos preparados mediante la extracción acuosa de alérgenos a la cual el paciente es alérgico. Ha sido utilizada en la mayor parte de este siglo para reducir la sensibilización. La mayoría de los trabajos no incluyen un protocolo clínico bien diseñado controlado con placebo, pero los datos eran tan importantes, con estudios abiertos, que esta forma de IT continuaba y era una buena herramienta para tratar a los pacientes. Posteriormente estudios controlados con placebo confirmaron que era posible desensibilizar a los pacientes como anteriormente se pensaba.

Con este tipo de vacunas las reacciones locales y sistémicas eran con frecuencia severas. Han contribuido en su seguridad, la estandarización de extractos, el cambio en la vía de administración (sublingual) y la modificación química de alérgenos para disminuir su alergenidad.

#### **3.4.2. Nuevas formas de inmunoterapia.**

##### **3.4.2.1. Antecedentes**

Los esfuerzos encaminados a modificar alérgenos para mejorar la inmunoterapia convencional ha seguido tres caminos: impedir la liberación de alérgenos en el lugar de inyección, inducir la tolerancia de los alérgenos y reducir la alergenidad manteniendo la inmunogenicidad de los alérgenos.

Históricamente el primer intento de modificar alérgenos para mejorar la IT convencional fue impedir la liberación de alérgenos del sitio de inyección. Para ello se utilizó la emulsión en aceite<sup>50</sup>, la precipitación en aluminio y la desnaturalización con urea<sup>51</sup>. Se consiguió una reducción modesta en el número de inyecciones y de reacciones sistémicas.

El segundo intento, suprimir la producción específica de IgE e inducir una tolerancia específica, no ha sido posible en humanos. Así, el acoplamiento del antígeno con polientilenglicol o dextrano demostró reducción de su actividad en un modelo animal. Esta reducción en la alergenicidad se interpretó como muy pequeña para poder ofrecer ventajas terapéuticas. Además se detectó la inducción de anticuerpos específicos frente al dextrano además de crearse determinantes antigénicos nuevos<sup>52,53,54,55</sup>, lo que añadía un argumento más para no proceder a la realización de estudios clínicos<sup>56,57</sup>

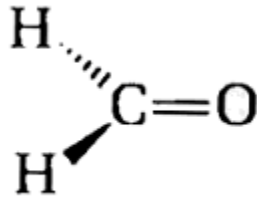
El tercer intento, reducir la alergenicidad, manteniendo la inmunogenicidad de los alérgenos ha sido el más exitoso y parece tener un gran futuro. La polimerización de alérgenos en moléculas de alto peso molecular utilizando aldehídos, del tipo formaldehído y glutaraldehído, han mostrado una disminución en la alergenicidad, eran mejor tolerados que los extractos nativos y precisaban de menos inyecciones para alcanzar la dosis de mantenimiento. Estos productos son conocidos como alergoides. La eficacia de los alérgenos modificados químicamente ha sido demostrada en numerosos estudios<sup>58,59,60</sup>.

Las principales premisas para que un alérgeno modificado tenga ventajas terapéuticas son: debe mostrar que tiene reducida su capacidad de reaccionar con IgE humana específica en los niveles peligrosos de respuesta, y que, al haber sido objeto de manipulación, no muestra nuevas especificidades antigénicas y/o alergénicas.

#### **3.4.2.2. Alergoides**

##### **-Formaldehído**

El formaldehído (metanal, figura 8) fue uno de los primeros reactivos usados para la polimerización de alérgenos.



**Figura 8.** Fórmula química del formaldehído

Carter en 1935<sup>61</sup> patentó la producción de alérgenos detoxificados por medio de formaldehído. El material preparado por este proceso fue evaluado por Stull en 1940<sup>62</sup>, que demostró la eficacia clínica de estos preparados, pero asociado con reacciones sistémicas que indicaban que la alergenicidad estaba parcialmente retenida.

Por analogía al proceso empleado en reducir la toxicidad de las toxinas tetánica y diftérica, que da lugar a los toxoides, Marsh les denominó alergoides<sup>63</sup>.

El formaldehído reacciona con las proteínas. Ni los aminoazúcares ni otros sacáridos son capaces de reaccionar con el formaldehído. El grupo diana del formaldehído es la función amino y la reacción puede ser de una considerable complejidad. Se observan uniones inter e intra moleculares, siendo estas últimas las preponderantes. Además pueden generarse sistemas cíclicos anulares<sup>64,65</sup>. Por ello la estructura terciaria de las proteínas se puede alterar.

Los ensayos clínicos en humanos<sup>66</sup> han demostrado eficacia clínica pero también han mostrado que se pueden inducir anticuerpos IgE específicos frente a los alérgenos tratados con formaldehído.

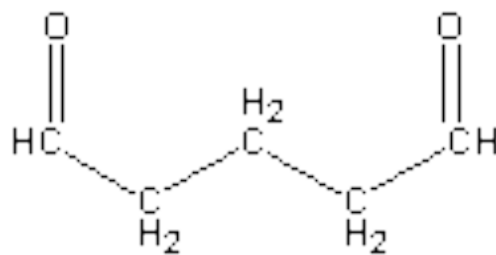
Las propiedades que se esperaban obtener de este nuevo producto era la de reducir la actividad de la IgE pero reteniendo la habilidad de inducir anticuerpos específicos IgG.

Se sabe que algunos alérgenos tienen epítomos frente a los dos tipos de inmunoglobulinas, IgE e IgG, por lo que se podía pensar que tanto la actividad de la IgE como la habilidad de inducir anticuerpos IgG podían estar ambas disminuidas en paralelo con el incremento de la modificación de los alérgenos. Pero existen evidencias

de que este no ocurre así. De todas maneras este problema sin resolver parece no tener importancia en la utilidad clínica de los alergoides, ya que son la estructura primaria de los alérgenos y los epítomos de las células T los requeridos para inducir la desensibilización.

### **-Glutaraldehído**

El glutaraldehído (1,5 pentanodial) es un agente homobifuncional usado desde hace mucho tiempo como agente polimerizante. Es una molécula con 5 átomos de carbono con dos grupos aldehído muy reactivos en cada uno de los extremos. La siguiente figura 9 muestra la fórmula química del glutaraldehído.



**Figura 9.** Fórmula química del glutaraldehído

La capacidad del glutaraldehído para unir proteínas, preservando al mismo tiempo su actividad biológica, ha hecho de él un reactivo de mucha utilidad.

La acción del glutaraldehído como agente capaz de unir proteínas no está claramente definida. A pesar de que existen controversias entre distintos autores, está aceptado que el glutaraldehído reacciona con los grupos amino mediante enlaces covalentes para formar productos de alto peso molecular<sup>67,68</sup>. Estos productos pueden ser particularmente “atractivos” a ciertas células presentadoras de antígenos (CPA). Se ha demostrado que los alérgenos modificados con glutaraldehído son capaces de modificar la producción de citoquinas favoreciendo la producción de IFN $\gamma$  con el subsiguiente cambio en el balance de actividad Th2-Th1, hacia una respuesta de tipo Th1 con una disminución de la producción de anticuerpos IgE<sup>69,70</sup>.

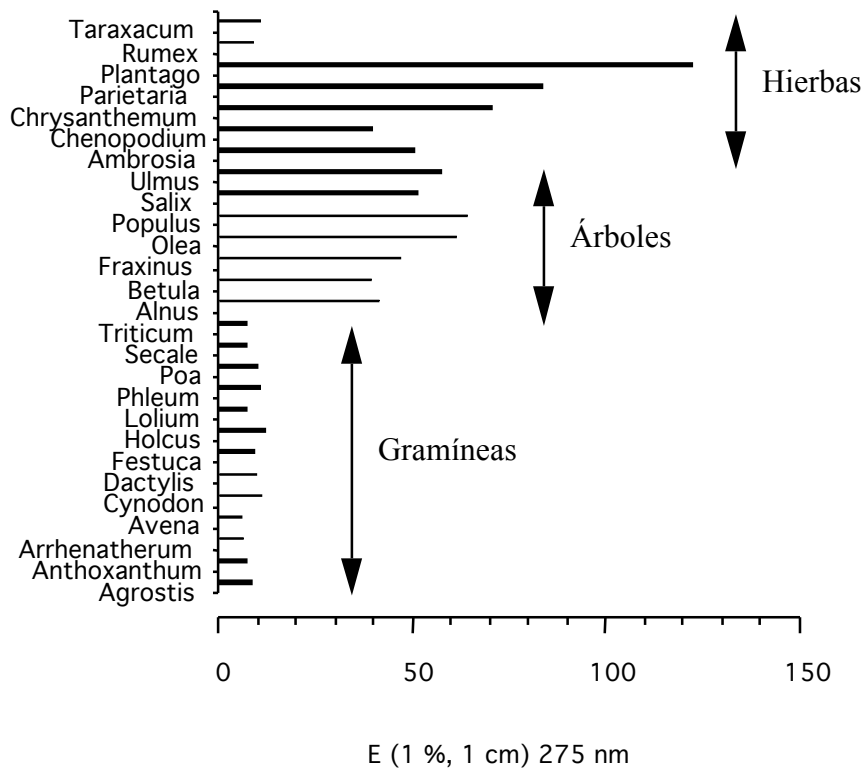
Así mismo, la eficacia clínica de este tipo de tratamiento con extractos alérgicos modificados se ha demostrado en hipersensibilidad de Tipo I frente a polen de ambrosía, polen de gramíneas, polen de árboles, veneno de abeja y ácaros del polvo doméstico<sup>71,72,73</sup>.

Cuando los extractos alérgicos son sometidos a un tratamiento suave con glutaraldehído, se forman polímeros que siguen conservando la misma capacidad inmunogénica (capacidad de inducir respuesta de IgG) y antigénica (capacidad de ser reconocidos por IgG específica) pero presentan una reducción importantísima en cuanto a su capacidad alérgica (capacidad de unirse a IgE específica). Este tipo de extracto alérgico polimerizado tiene una probabilidad menor de formar puentes con la IgE que está presente en la superficie del mastocito sensibilizado.

#### **-Pigmentos**

Un intento más de purificar alérgenos, consiste en la eliminación de pigmentos que tienen los pólenes.

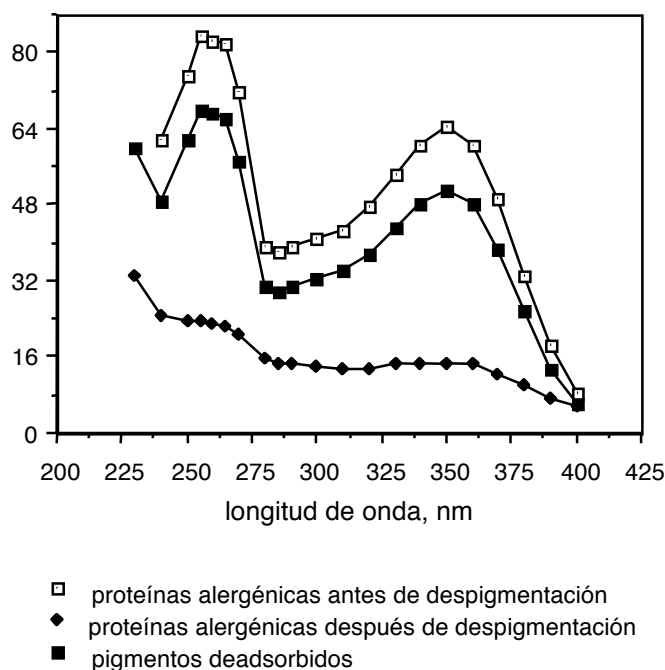
Un análisis químico y espectroscópico de los extractos polínicos convencionales muestra que una proporción importante de pigmentos vegetales, especialmente flavonoides<sup>74,75,76,77,78,79</sup> no está siendo eliminados durante la etapa de diálisis y permanecen estrechamente adsorbidos a la superficie de las proteínas. Los pigmentos residuales (flavonoides) de los extractos tradicionales de proteínas de polen se revelaron en el espectro de absorción UV (donde los máximos se suelen observar en la región de 350-360 nm) como causantes de la elevación inespecífica del máximo de absorción típico de las proteínas a 275 nm<sup>80,81,82</sup>. Este efecto es evidente sobretodo con los alérgenos proteicos de alto peso molecular de los extractos de polen de árboles y hierbas (figura 10).



**Figura 10** Coeficientes de extinción en el pico principal de proteínas del espectro de absorción UV de una serie de extractos clásicos de alto peso molecular de polen alergénico. Especialmente para los extractos de polen de hierbas y árboles estas densidades ópticas se elevan hasta valores disparatados debido a la distorsión por la absorción de pigmentos vegetales asociados a proteínas.

La fuerte asociación de proteínas alergénicas con pigmentos flavonoides adsorbidos físicamente es claramente desaconsejable. Se sabe que los flavonoides afectan al metabolismo del ácido araquidónico e interaccionan inespecíficamente como polifenoles con macromoléculas como pueden ser las inmunoglobulinas<sup>83</sup>. De hecho la interacción fuerte con proteínas es una propiedad general de los polifenoles, de sus productos de oxidación y de sus polímeros del tipo de los taninos<sup>84,85,86</sup>. En su forma libre, se sabe que los flavonoides y sus glicósidos hidrosolubles inhiben la liberación de histamina de los mastocitos y basófilos<sup>87,88</sup>, modulan las funciones de leucocitos polimorfonucleares y neutrófilos<sup>89,90,91,92</sup> e inhiben la fosfodiesterasa del AMP cíclico<sup>93</sup>. Los espectros de absorción UV de la figura 11 ilustran la eficacia del proceso de

separación de flavonoides y otros constituyentes vegetales extraños de bajo peso molecular de las proteínas alergénicas para uso humano<sup>94,95</sup>.



**Figura 11.** Extracto total de proteínas alergénicas de alto peso molecular del polen de *Ambrosia elatior*: efecto de la eliminación de pigmentos adsorbidos físicamente a los alérgenos proteicos.

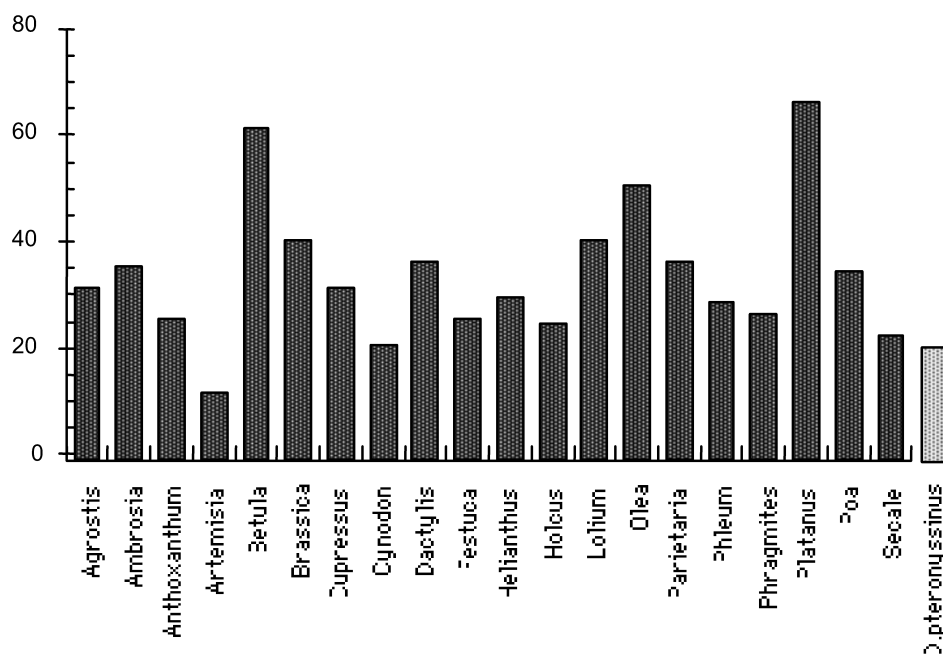
Desde hace tiempo se sabe que los glicósidos de flavonoides de bajo peso molecular (<5 kDa), en su forma, libre son inactivos en pruebas cutáneas y no contribuyen a la unión específica con los anticuerpos IgE de pacientes alérgicos específicamente sensibilizados<sup>96,97,98</sup>.

Un argumento adicional para eliminar los componentes de bajo peso molecular adsorbidos a las proteínas alergénicas de polen es que muchas especies de pólenes, como las plantas que los producen, pueden contener compuestos orgánicos no flavonoides de masa muy pequeña (peso molecular <1 kDa) potencialmente perjudiciales para el ser humano, por ejemplo alcaloides tóxicos, benzoquinonas,

terpenoides y otras estructuras aromáticas así como péptidos pequeños, muchos de ellos irritantes de las membranas mucosas<sup>99</sup>. Como los flavonoides, estos componentes suelen resistir la diálisis simple o ultrafiltración por membranas de límite nominal de 3 kDa permaneciendo firmemente adsorbidos por fuerzas físicas a las proteínas.

El proceso de despigmentación de extractos alergénicos es un proceso patentado<sup>100</sup> (hidrólisis ácida-diálisis suave) que origina una reducción considerable del peso del residuo seco del material liofilizado proteico en los extractos alergénicos. Como se muestra en la figura 7, entre el 25-65% del material no dializable liofilizado de los actuales extractos alergénicos de polen se está eliminando por despigmentación como material alergológicamente irrelevante.

Por lo tanto el uso de proteínas despigmentadas de polen minimiza la administración de sustancias extrañas no deseadas y no alergénicas. Además, al liberar grupos amino, se incrementa el grado de polimerización, dando lugar a polímeros más solubles.



**Figura 12.** Porcentaje de material liofilizado de alto peso molecular, de extractos de polen eliminado sustancias irrelevantes de bajo peso molecular adsorbidas a proteínas.

Debido a que los compuestos de bajo peso molecular adsorbidos físicamente bloquean grupos amino libres de los alérgenos proteicos, la despigmentación libera sitios reactivos críticos para el proceso de entrecruzamiento durante la preparación de derivados de alérgenos polimerizados.

Las proteínas despigmentadas de polen representan por tanto la fuente ideal para la producción de alergoides.

### **3.4.2.3. Mecanismo de acción de los alergoides**

Los alergoides tienen disminuida su alergenicidad (habilidad de mediar reacciones mediadas por IgE) por la destrucción de la conformación de los epítomos de alérgenos de las células B, mientras que mantienen su inmunogenicidad (la inducción de IgG y la modulación de la respuesta inmunológica) mediante el mantenimiento de los epítomos de los alérgenos para las células T.

La reducida alergenicidad de los polímeros se puede explicar por varios motivos<sup>101</sup>:

1. La larga estructura polimérica puede ocultar determinantes antigénicos incapaces de unirse con la IgE. De esta manera el polímero es preferencialmente procesado por células fagocíticas (monocitos, macrófagos y células dendríticas) y pueden todavía transmitir completa información inmunológica a las células productoras de anticuerpos.
2. Debido a su menor concentración molecular que los antígenos monoméricos pueden tener disminuida la habilidad de crear puentes de IgE con los mastocitos y liberar mediadores.

3. Los polímeros de alto peso molecular pueden difundirse más lentamente en los tejidos que los pequeños monómeros.

Los alérgenos, sin epítopos de células B, utilizan la fagocitosis o pinocitosis mediante los monocitos, macrófagos o células dendríticas, y así evitan la interacción con la IgE y las células presentadoras mediadas por IgE mastocitos, basófilos, células de Langerhans, eosinófilos y células epidérmicas. Este efecto induce un balance de citoquinas Th0 o Th1 por las células T, (IL-10 principalmente) resultando en poca producción de IgE pero mucha de IgG por las células B de memoria.

El mecanismo de acción de la IT, aunque todavía poco claro, está basado en la inhibición de las citoquinas de las células Th2: IL-4, IL-5 e IL-3, y la activación de las citoquinas de las células Th1: IFN- $\gamma$  y la inducción de la IL-10, una citoquina con una función supresora.

La capacidad de los alérgenos de activar las células T había sido demostrada en animales, mediante un cambio en el perfil de citoquinas Th1 durante el tratamiento con alérgeno de ovoalbúmina. Este fenómeno fue demostrado en ratones<sup>102</sup>. En humanos solo existían evidencias indirectas sobre la actividad de los alérgenos sobre las células T ya que la síntesis de IgG específica es un proceso mediado por células T.

Un estudio demostró la reducida capacidad de los alérgenos de activar las células Th, sugiriendo que el alérgeno y alérgeno tenían la misma actividad inmunoreguladora y que el beneficio de la IT con alérgenos se basa en la repetida estimulación de las células T más que en una actividad intrínseca de los alérgenos de inducir un diferente tipo de respuesta inmunológica que el alérgeno nativo. Y que esta variabilidad en la activación de las células T depende de la respuesta de los pacientes a la IT<sup>103</sup>.

Estudios recientes han demostrado que los alérgenos tienen una gran capacidad de estimular a las células T, y que esta capacidad es dependiente de la CPA<sup>104</sup>. Las células

dendríticas y los macrófagos inducen una estimulación de las células T por los alérgenos, mientras que los monocitos presentan una reactividad baja y es nula para las células B. La producción de IL-12 se ha observado solo cuando el alérgeno o el antígeno son presentados por células dendríticas. Así mismo la producción de IL-10 se ha asociado con la producción de IL-12 desde las células dendríticas. Estas diferencias parecen ser atribuibles a la manera particular de “coger” a los antígenos. Las células dendríticas y los macrófagos utilizan la macropinocitosis o fagocitosis<sup>105</sup>.

Los monocitos no son las células diana de la inmunoterapia específica por vía subcutánea. En la piel, las CPA más potentes son las células dendríticas, que son esenciales para el inicio de la respuesta inmune mediada por las células T para los antígenos. Estas células dendríticas son inmaduras con gran capacidad para capturar y procesar los antígenos, pero con poca capacidad de estimular a las células T. Durante la migración se hacen células dendríticas maduras, con pérdida en la capacidad de capturar los antígenos, pero adquieren la capacidad de estimular a las células T.

También se ha demostrado que los macrófagos, son CPA capaces de activar las células T.

### **Alergoides de bajo peso molecular**

Algunos estudios han demostrado que alérgenos monoméricos modificados químicamente reducen la capacidad de unión de IgE mediante el uso de cianato potásico a pH neutro para sustituir  $\epsilon$ -amino grupos de lisina. Estos alérgenos de bajo peso molecular son capaces de atravesar las membranas biológicas y ser susceptibles de la administración sublingual<sup>106</sup>. En esta línea se han utilizado también derivados de ácidos anhídridos, como el anhídrido succínico o maléico<sup>107</sup>.



## **II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



## 1. JUSTIFICACIÓN.

Desde la introducción de la inmunoterapia por Noon en 1911<sup>108</sup> todos los avances en el campo de la inmunoterapia, se han centrado en mejorar la seguridad del tratamiento, para reducir los efectos adversos relacionados. Por ello se han ido modificando las pautas de administración, mejoras en los adyuvantes, atenuando la actividad alérgica (alergoides)...<sup>109</sup>

El diagnóstico molecular por componentes nos permite en el momento actual conocer la sensibilización de nuestros pacientes a los distintos alérgenos que pueden intervenir en su clínica. Esto resulta de vital importancia, puesto que a la hora de formular el tratamiento específico con inmunoterapia, solamente se pueden producir unas mezclas predeterminadas de extractos debido a que los procedimientos de registro son extremadamente complejos y caros<sup>110</sup>.

Por este motivo consideramos importante realizar estudios como el nuestro que nos permitan conocer el perfil de sensibilización de nuestros pacientes para poder afinar el diagnóstico y que esto nos permita mejorar el tratamiento que realizan.

El tratamiento farmacológico solo mitiga los síntomas alérgicos, mientras que la inmunoterapia es el único tratamiento, en el momento actual, que modifica la evolución natural de la enfermedad actuando sobre los responsables de la patología<sup>111</sup>.

A pesar de la evidencia clínica, los mecanismos celulares e inmunológicos inducidos por la inmunoterapia están aun por esclarecer.

Aunque estudios previos han demostrado que los niveles séricos de la IgE específica, mediador de la respuesta alérgica, sufre modificaciones durante la inmunoterapia, no se ha evaluado si diferentes pautas de tratamiento están implicadas en una mayor o menor respuesta en la evolución de esta.

Está descrito que durante los primeros meses de tratamiento se produce un incremento en los niveles de IgE, como ocurre con la exposición natural al alérgeno. Posteriormente hay una fase de meseta donde no hay alteraciones significativas y, finalmente, un descenso progresivo hasta alcanzar niveles inferiores a los existentes antes de empezar con el tratamiento de inmunoterapia<sup>112</sup>. No hay muchos estudios que valoren las modificaciones existentes en el resto de inmunoglobulinas.

Nos planteamos en este proyecto, que diferentes pautas de administración de inmunoterapia y en diferentes épocas del año, puede dar lugar a perfiles de evolución inmunológica diferente, por lo que analizaremos la evolución de IL4, IL5, IL10 e IFN $\gamma$  en distintos grupos de tratamientos.

## **2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO.**

### 2.1 Objetivos Principales.

- Determinación de los perfiles de sensibilización alérgica IgE e IgG<sub>4</sub> de pacientes diagnosticados clínicamente como alérgicos a *Phleum pratense*. Estudio de sensibilización a los componentes moleculares Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5b, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 11 y Phl p 12.
- Estudio de modificación de los marcadores inmunológicos IgE e IgG<sub>4</sub> tras la administración de diferentes pautas de inmunoterapia con extracto despigmentado polimerizado de *Phleum pratense*.
- Valorar si las modificaciones inmunológicas están condicionadas por el periodo estacional y/o el tiempo transcurrido hasta alcanzar una dosis acumulada de extracto alérgico administrado.
- Evaluar los niveles de mediadores inmunológicos IL4, IL5, IL10 e IFN $\gamma$  circulantes en suero, antes y después del tratamiento en diferentes pautas de administración.

### 2.2 Objetivos secundarios.

- Estudiar y evaluar el perfil de seguridad en diversas pautas de administración de la inmunoterapia.



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1. PACIENTES**

Este estudio se inició en octubre del 2008 finalizándose al cabo de tres años. De los pacientes que acudieron en este periodo a consultas externas de la Sección de Alergia del Hospital Universitario Guadalajara se incluyeron un total de 139. Todos los pacientes cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión, siendo estos criterios los siguientes.

## **2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Varón o mujer con edad mayor o igual a 18 años.
- Historia clínica de rinitis y/o asma bronquial por pólenes de gramíneas de al menos 1 año de evolución.
- Pruebas cutáneas positivas para gramíneas mediante SPT (skin prick test) con un diámetro de pápula mayor a 3 mm. Antes de la realización de las pruebas cutáneas todos los pacientes suspendieron el tratamiento con antihistamínicos durante al menos 5 días (30 días en el caso de astemizol).
- IgE sérica específica positiva para gramíneas.
- Deseo de cumplir con el presente protocolo de estudio.

## **3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Inmunoterapia previa con polen de gramíneas en los últimos 5 años.
- Examen físico con hallazgos clínicamente relevantes.
- Asma grave o no controlado (VEMS<70%).
- Tratamiento previo con anti-IgE (Xolair®, Novartis).
- Tumores malignos.
- Enfermedades sistémicas que afecten al sistema inmunológico.
- Cualquier trastorno mental que imposibilite al sujeto la comprensión de la naturaleza del ensayo y/o evidencia de actitud no colaboradora.
- Dificultades para completar el ensayo.

A todos los pacientes se les explicó de manera pormenorizada el diseño del estudio, otorgando todos ellos el consentimiento para la participación en este estudio quedando por escrito en el documento de consentimiento informado. A todos ellos se les entregó una copia de dicho consentimiento informado firmado por el investigador principal. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario de Guadalajara (Anexo 1).

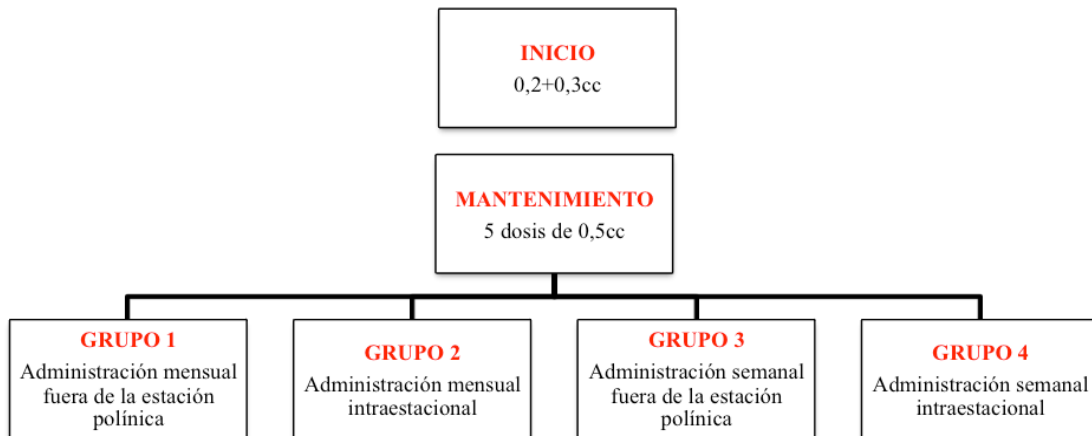
#### **4. GRUPOS DE PACIENTES.**

Se trató de un estudio prospectivo abierto. Se reclutaron un total de 139 pacientes que cumplían con todos los requisitos de inclusión que nos habíamos marcado con anterioridad.

Los pacientes fueron seleccionados por presentar patología respiratoria, ya sea en forma de rinoconjuntivitis o rinoconjuntivitis y asma bronquial extrínseca

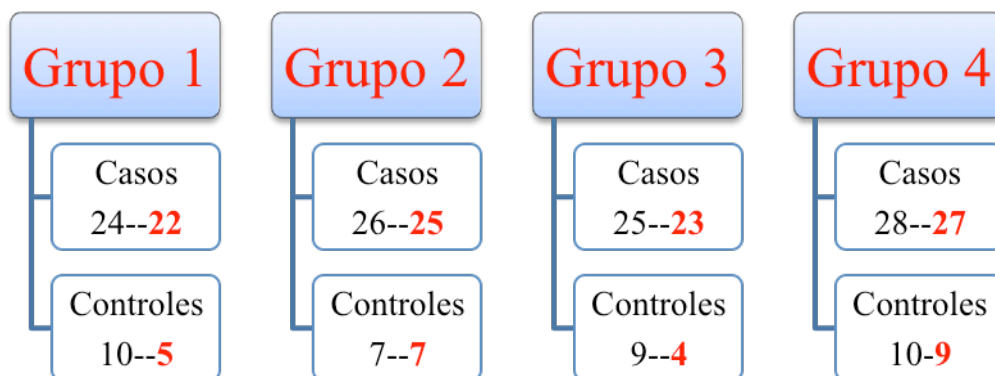
Se indicó inmunoterapia para pólenes de gramíneas dentro del tratamiento global de su enfermedad en 103 pacientes que fueron separados en cuatro grupos en función del momento temporal en el cual acudían a nuestra consulta y se indicaba la inmunoterapia específica. En todos los grupos se incluyeron pacientes control que presentaban historia clínica de alergia a pólenes que no recibieron inmunoterapia específica (en total 36 pacientes control)

A todos los grupos que recibieron tratamiento se les administró un extracto despigmentado-polimerizado de gramíneas 100% (Depigoid®, Laboratorios Leti S.L., Madrid, España). La pauta de inicio consistía en la administración de 0,2cc + 0,3cc separadas con intervalos de 30 minutos. Tras concluir esta fase de iniciación, se administraron cinco dosis de 0,5 cc de mantenimiento, variando el intervalo del mismo según el grupo al que estuviera asignado el paciente (Tabla 3).



**Tabla 3.** Pautas de administración de la inmunoterapia.

A continuación se detallan los distintos grupos de estudio (Tabla 4)



**Tabla 4.** Grupos de pacientes incluidos en el estudio. En negro número de pacientes incluidos en el estudio. En rojo los pacientes que finalizan el protocolo.

- **Grupo 1:** En este primer grupo la dosis de mantenimiento de 0,5 cc se mantuvo mensualmente fuera de la estación polínica y fueron incluidos 34 pacientes. Se pautó el tratamiento con inmunoterapia a 24 de ellos con un grupo de 10 pacientes control. De los 24 pacientes a los cuales se les pautó la inmunoterapia finalizaron el protocolo de estudio 22 de ellos y del grupo control 5 pacientes.

- **Grupo 2:** En este grupo la dosis de mantenimiento de 0,5 cc se mantuvo mensualmente durante cinco meses coincidiendo con la estación polínica y se incluyeron 33 pacientes en total. De ellos se indicó inmunoterapia en 26 de los pacientes con un grupo de 7 pacientes control. Del total de pacientes a los cuales se les indicó la inmunoterapia finalizaron 25 el protocolo existente y del grupo control no hubo ningún abandono.
- **Grupo 3:** La dosis de mantenimiento de 0,5 cc se mantuvo semanalmente durante cinco semanas consecutivas fuera de la estación polínica y en este un grupo se incluyeron 34 pacientes. Se pautó la inmunoterapia específica a 25 de ellos, finalizando 23 de ellos el protocolo. Al igual que los grupos anteriores existió un grupo de pacientes control, en este grupo 9, finalizando el protocolo 4 de ellos.
- **Grupo 4:** La dosis de mantenimiento en este grupo fue de 0,5 cc durante cinco semanas dentro de la estación polínica y en este cuarto y último grupo se incluyeron 38 pacientes. Se indicó inmunoterapia a 28 de ellos, finalizando 27 el protocolo de estudio. Igualmente existió un grupo control de 10 pacientes del que uno abandonó el protocolo de estudio.

En total finalizaron el protocolo de estudio 97 pacientes que recibieron inmunoterapia en las distintas pautas de estudio y 25 pacientes dentro del grupo control.

## **5. ABANDONOS DEL ESTUDIO**

De los pacientes que no completaron el estudio, un paciente del grupo activo del grupo 1 y el paciente del grupo activo del grupo 2 abandonaron por motivos económicos, un paciente del grupo activo del grupo 3 tuvo un cuadro depresivo mayor y no acudió más a consulta y, el resto de abandonos se produjo por falta de interés en seguir con el estudio o tratamiento.

Se contactó telefónicamente con todos los pacientes en los días previos al inicio de la inmunoterapia para recordarles la fecha y hora en la cual debían acudir a nuestra consulta.

## **6. ESTACIÓN POLÍNICA**

Se consideró estación polínica el periodo comprendido entre marzo y julio, teniendo en cuenta los recuentos polínicos de años previos en el captador de pólenes situado en Guadalajara. Se realizaron recuentos polínicos a lo largo de todo el año que duró este estudio, suministrados por la Red Española de Aerobiología.

Para el muestreo aerobiológico se utilizó un captador volumétrico tipo Hirst (modelo Lanzoni, VPPS 2000) instalado a 709 metros sobre el nivel del mar, en la azotea del edificio San José de la Diputación de Guadalajara, cuyas coordenadas son: 40° 37' 47.78" N, 3° 10' 15.19" O.

La metodología de muestreo y el contaje de las muestras siguieron la propuesta por la Red Española de Aerobiología<sup>113</sup>.

## **7. PRUEBAS CUTÁNEAS *in vivo* DE HIPERSENSIBILIDAD INMEDIATA.**

En la primera visita en consulta se realizaron pruebas cutáneas con la batería estándar de neumoaérgenos, que habitualmente es realizada en todos los pacientes con patología respiratoria que acuden a consulta para comprobar o descartar la etiología alérgica de la enfermedad, según la prevalencia de sensibilización en nuestra área geográfica. En todo momento de emplearon extractos alérgicos biológicamente estandarizados.

La batería estándar utilizada incluyó:

- Ácaros: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Acarus siro*.
- Pólenes de árboles: *Cupressus arizónica*, *Platanus acerifolia*, *Olea europaea*.
- Pólenes de gramíneas (*Lolium perenne*, *Phragmites communis*, *Phleum pratense* y *Cynodon dactylon*)

- Pólenes de hierbas: *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium album*, *Salsola kali*, *Plantago lanceolata*, *Parietaria judaica*.
- Profilina de palmera a 0,1 mg/ml. (no estandarizada)
- Hongos: *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium cladosporoides*
- Epitelios de animales: gato, perro.
- Cucaracha: *Blatella germanica*.

Como control positivo se utilizó prick de histamina a una concentración de 10 mg/ml y como control negativo suero fisiológico glicerinado al 50%.

Todos los extractos alergénicos para las pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata se estandarizaron a 30 HEP/ml (Histamin equivalent prick) de Laboratorios LETI S.L.

Antes de la realización de las pruebas cutáneas se comprobó que la zona donde se iba a realizar no presentaba daño tisular o alteración cutánea así como que el paciente no presentase ninguna enfermedad o estuviera recibiendo medicación que interfiriera con los resultados de la prueba.

Las pruebas cutáneas fueron realizadas según las normas del *position paper* de la *European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI)*<sup>114</sup>.

La zona del antebrazo en la cual se realizaron las pruebas cutáneas fue la comprendida entre unos 5 cm por encima de la muñeca y unos 3 cm por debajo del codo. Tras marcar con rotulador, se depositó una gota de cada extracto, separados entre sí al menos por 2 cm. A través de la gota, con un ángulo de 90° con respecto a la piel, se punzó con una lanceta de 1 mm de punta (Stallergenes, Francia). En todo el procedimiento se evitó el sangrado, y en caso de que se produjera se repitió de nuevo para evitar falsos positivos. Se empleó una lanceta para cada extracto con el fin de no mezclarlos. La lectura de la reacción inmediata se realizó a los 15 minutos, dibujándose el habón y eritema con

rotulador de punta fina traspasándose a cinta adhesiva transparente, aplicando directamente sobre el dibujo cutáneo y, posteriormente, pegándolo en papel.

Se consideró como prueba positiva aquellas con un diámetro de pápula  $\geq 3$  mm que el control negativo<sup>115</sup>.

En todos los pacientes se realizó un control negativo para descartar la presencia de un dermatografismo.

## **8. PRUEBAS *IN VITRO***

### **8.1 Extracción sanguínea.**

Para la realización del estudio *in vitro*, se hicieron dos extracciones de sangre periférica a todos los pacientes. La primera de ellas antes de iniciar el tratamiento con inmunoterapia y la segunda al finalizar dicho tratamiento, momento en que finaliza el estudio.

Se citó el paciente en la consulta de Alergología del H.U de Guadalajara, y en condiciones de asepsia, se realiza la venopunción con el sistema Vacutainer® (Becton-Dickinson, San José, California, EEUU), distribuyéndose la muestra sanguínea en dos tubos estériles al vacío con gel separador Venosafe® de 5 cc. 13x75 mm .

Estos cuatro tubos se centrifugaron en una centrífuga CEP 2000(Capricorn Laboratory Equipment,EEUU) durante 15 minutos a 6000 rpm, separándose el suero de las células sanguíneas .

Mediante este procedimiento se obtuvieron aproximadamente unos 10 cc de suero siendo distribuidos en cuatro tubos estériles de almacenamiento y etiquetados con el número asignado al paciente según el grupo de estudio al que pertenecen y con la letra A o B, con la cual se señala la muestra inicial antes de la inmunoterapia (A) y la segunda extracción al finalizar el estudio (B).

Estas muestras fueron congeladas a -20 °C en el congelador, siendo almacenadas hasta su posterior traslado para realizar el estudio *in vitro*.

Este traslado se realizó manteniendo en todo momento la congelación de las muestras.

## **8.2 Elaboración de extractos alergénicos.**

### **8.2.1 Extractos nativos de *Lolium perenne*, *Phragmites communis*, *Phleum pratense* y *Cynodon dactylon*.**

Se utilizó como materia prima polen de *L. perenne*, *P. communis*, *P. pratense* y *C. dactylon* (con una riqueza superior al 95%), suministrada por: Lote 1: Laboratorios Biopol (Spokane, Washington, EEUU); Lote 2: Laboratorios Greer (Lenoir, USA); Lote 3: Laboratorios Allergon (Angelholm, Suecia).

Los pólenes, se disolvieron en tampón PBS 0,01 M pH=7,4 (phosphate buffered saline, cuya composición es: NaCl 0,137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM) en proporción 1:10 (p/v) y se dejaron agitando en cámara fría a 4°C durante 4 horas. A continuación se centrifugaron a 10000 rpm durante 30 minutos, entre 4°C-15°C.

Se recogió el sobrenadante, y se realizó una segunda extracción en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Los dos sobrenadantes obtenidos se mezclaron y filtraron secuencialmente (con filtros de nitrocelulosa) hasta un tamaño de 0,22 µm. A continuación, se dializaron en membranas de diálisis (Seguin, TX, USA) de corte molecular 3500 D, a 4° C durante 24 horas frente agua y con varios cambios sucesivos. Finalmente se liofilizaron.

### **8.2.2 Extractos despigmentados de *L. perenne*, *P. communis*, *P. pratense* y *C. dactylon*.**

Se reconstituyó el liofilizado nativo con agua, de manera que quedara a una concentración final de 10 mg/ml.

Bajo agitación constante y a temperatura ambiente, se ajustó el pH de los extractos entre 2,0-2,1 con una solución de HCl .

Una vez ajustado el pH, se mantuvo en agitación constante durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se dializaron a 4°C durante 24 horas frente agua de segunda ósmosis, empleando membranas de diálisis de corte molecular 3500 D.

Bajo agitación constante y a temperatura ambiente, se ajustó el pH de los extractos entre 7,0-7,1 con NaOH.

Se filtraron secuencialmente hasta un tamaño de 0,22 µm para posteriormente liofilizarlos.

### **8.2.3 Extractos polimerizados *L. peremne*, *P. communis*, *P. pratense* y *C. dactylon*.**

Los extractos despigmentados de *L. peremne*, *P. communis*, *P. pratense* y *C. dactylon*, se reconstituyeron con PBS 0,01M. En condiciones de agitación mecánica constante y temperatura ambiente se realizó el proceso de polimerización. La polimerización se realizó añadiendo, glutaraldehído al 50%.

La agitación mecánica se mantuvo durante 7 horas a temperatura ambiente. El proceso de polimerización se paró mediante la adición de glicina, manteniendo la agitación durante 18 horas en cámara fría (4-8°C)<sup>116</sup>.

Para eliminar la glicina y todos los componentes del extracto que no han polimerizado y que tienen un peso molecular inferior a 100 kDa, este extracto se sometió a un proceso de diálisis tangencial en un sistema de Minitan (Millipore, Bedford USA) con membranas de 100 kDa. Posteriormente se adsorbieron en Hidróxido de aluminio. (Según protocolos internos de laboratorio). Una vez dializado se filtró secuencialmente y se liofilizó.

El grado de polimerización se comprobó determinando las aminas primarias empleando un método fluorométrico (Floram), basado en la reacción casi inmediata de la fluoresceína con dichas aminas primarias que produce compuestos fluorescentes que son estables durante horas en la oscuridad<sup>117,118</sup>.

### **8.3 Estudio inmunológico realizado en los sueros de los pacientes**

### **8.3.1 Determinación de la IgE específica**

En las muestras de suero recibidas de los pacientes que completaron el estudio, se determinó la IgE específica antes y después de la inmunoterapia. La IgE específica se midió mediante el sistema ImmunoCAP 100® (ThermoFisher, Uppsala, Suecia). Se midió la IgE específica de la mezcla de gramíneas gx1 (*Dactylis glomerata*, *Festuca elatior*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense* y *Poa pratensis*). Además, se midió la IgE específica de cada uno de los alérgenos individuales disponibles de *Phleum pratense*: rPhl p 1, rPhl p 2, nPhl p 4, rPhl p 5b, rPhl p 6, rPhl p 7, rPhl p 11 y rPhl p 12. (la r delante del nombre del alérgeno indica que es de origen recombinante y la n que es nativo). La presencia de IgE específica frente a glúcidos se determinó con MUXF3 (bromelina), mediante el immunoCAP o214.

La técnica de immunoCAP es automática y cuantitativa, y da los resultados en kUA/l, siendo UA Unidades alérgeno específicas. Estas son detectables en un rango de 0,1-100 kUA/l. El límite para considerar un valor positivo está establecido en 0,35 kUA/l.

### **8.3.2 Determinación de la IgG<sub>4</sub> específica**

En todas las muestras de suero recibidas de pacientes que completaron el estudio (A y B) se realizó un ensayo de ImmunoCAP para cuantificar la cantidad de IgG<sub>4</sub> específica. Se utilizó el immunocap Gg6 (*P. pratense*). El resultado se expresa en mgA/l y en este caso, no hay un punto de corte que determine la positividad de un valor. Con aquellos sueros seleccionados por tener los valores de IgG<sub>4</sub> específica más altos, se realizó un análisis por componentes. Para ello, se seleccionaron los sueros con valores de Gg6 mayores de 0,5 mgA/l y se analizaron los alérgenos rPhl p 1, rPhl p 2, nPhl p 4, rPhl p 5b, rPhl p 6, rPhl p 7, rPhl p 11 y rPhl p 12 con el método de IgG<sub>4</sub> antes y después del tratamiento.

### **8.3.3 Ensayo de ImmunoCAP inhibición**

La influencia de los glúcidos en el reconocimiento de la proteína nPhl p 4 (la única nativa de las utilizadas) se midió mediante ensayos de inhibición en ImmunoCAP. Los sueros positivos a MUXF3 y cinco controles con valores mayores de 20 kUA/l para nPhl p 4 y negativos para bromelina se incubaron a una dilución  $\frac{1}{2}$  con cantidades de bromelina (ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA) de 0,1 a 10 mg/ml durante 2 horas. Posteriormente se utilizaron en un ensayo de IgE específica en el ImmunoCAP con el alérgeno nPhl p 4. Con los datos obtenidos se obtuvieron rectas de inhibición con las que se calculó la cantidad de bromelina necesaria para alcanzar un 50% de inhibición para cada uno de los sueros.

#### **8.3.4 Determinación de los niveles de interleucinas (IL) en los sueros**

En las muestras de sueros A y B se analizaron los niveles de IL4, IL5, IL10 e IFN $\gamma$ .

Se utilizaron los siguientes kits, todos ellos de BLK Diagnostics (Badalona, España): Human IL-4 High Sensitivity ELISA, Human IL-5 ELISA, Human IL-10 ELISA High Sensitivity y Human IFN $\gamma$  ELISA High Sensitivity.

La placa ya tapizada que viene en el kit se lavó con 400  $\mu$ l de “Wash Buffer” (se recibe 20 veces concentrado y se diluyó con agua antes de su utilización) dos veces. Se prepararon las diluciones del estándar según se indicaba en cada uno de los kits, posteriormente, se dosificó la cantidad necesaria en los pocillos B1 y B2 y se realizaron diluciones seriadas  $\frac{1}{2}$  en “Sample Diluent” hasta los pocillos H1 y H2. En los pocillos A1 y A2 se añadieron 100  $\mu$ l de “Sample Diluent” (blancos). Se añadieron 50  $\mu$ l de “Sample Diluent” a los pocillos donde van a ir las muestras y otros 50  $\mu$ l de cada uno de los sueros. En todos los pocillos se añadieron 50  $\mu$ l de “Biotin-Conjugate” (este reactivo se preparó en el momento de su utilización diluyéndolo 100 veces con “Sample Diluent”). Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación a 200 rpm. Se lavó la placa 6 veces con “Wash Buffer” y se añadieron 100  $\mu$ l de “Streptavidin-HRP” (este reactivo se preparó en el momento de su utilización

diluyéndolo 600 veces con “Assay Buffer”), se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente a 200 rpm. Se lavó de nuevo 6 veces. En los casos de los kits “High Sensitivity”, en este momento se añadieron 100 µl de “Amplification Solution I” (preparada en el momento diluyendo 200 veces con “Amplification Diluent”) y se mantuvo durante 15 minutos en agitación. Se lavaron y se añadieron 100 µl de “Amplification Solution II” (preparada en el momento diluyendo 250 veces con “Assay Buffer 1x”) y se mantuvo durante 30 minutos en agitación. Tras lavar de nuevo 6 veces se procedió al desarrollo de la placa. En el caso de IL-5, al no ser de alta sensibilidad, el desarrollo se realizó después de la incubación con “Streptavidin-HRP”. Se añadieron 100 µl de “TMB Substrate Solution” en cada pocillo y se incubó durante 10 minutos. La reacción se paró añadiendo 100 µl de “Stop Solution”. El resultado se obtuvo leyendo la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific). Los datos obtenidos para el estándar se representaron en un gráfico y se calculó la curva patrón. Con dicha curva se calcularon las cantidades de cada una de las IL analizadas (pg/ml) en los sueros.

### **9. Administración de la inmunoterapia.**

En los cuatro grupos de tratamiento se emplearon el mismo extracto de pólenes de gramíneas 100% despigmentado-polimerizado, siguiendo una pauta de inicio idéntica en todos ellos, administrándose 0,2 cc+0,3cc del vial 2 con un intervalo de 30 minutos. Posteriormente siguieron su tratamiento con distintas pautas de mantenimiento, tal y como se detalló en el apartado “Grupos de pacientes”.

En todos los pacientes, previo a la administración de la inmunoterapia, se realiza una valoración de la estabilidad clínica.

La administración de la inmunoterapia fue mediante inyección subcutánea en el brazo, en la zona equidistante entre el codo y el hombro, utilizando jeringuillas desechables de 1 cc que vienen adjuntas a la inmunoterapia pautada.

El paciente se mantuvo en observación en nuestra consulta durante 30 minutos tras la administración de la última dosis, en el caso del tratamiento de inicio, o tras la dosis total en el caso del mantenimiento, momento en el cual se hizo una nueva valoración clínica para detectar posibles reacciones adversas locales o sistémicas inmediatas.

Se consideraron reacciones adversas locales aquellas en las que exista un eritema e induración superior a 5 cm y reacciones sistémicas aquellos que aparecen a distancia del punto de inyección, siguiendo la clasificación de la *EAACI*<sup>119</sup>:

- Grado 0 No reacción.
- Grado 1 Leves síntomas sistémicos como rinitis moderada o asma bronquial que cede con antihistamínicos o agonistas  $\beta_2$  de acción corta.
- Grado 2 Síntomas sistémicos moderados como urticaria, angioedema o asma bronquial grave que responde a tratamiento.
- Grado 3 *Shock* anafiláctico, instauración brusca de eritema, prurito, obstrucción bronquial...

## **10. Metodología estadística.**

En el presente trabajo experimental se aplicó el estudio estadístico de los resultados según el modelo de investigación científico en el que estuvieran encuadrados, siguiendo el diseño de estudios científicos elaborado por Doménech<sup>120</sup>. A continuación se describen cada uno de los diseños estadísticos que aparecen en el presente trabajo:

- Estudio de determinación de Inmunoglobulinas específicas (IgE, IgG<sub>4</sub>)
- Estudio de determinación de interleucinas
- Ensayo de determinaciones entre grupo de pacientes
- Comparativas entre valores antes y después de IT y entre los grupos activo y controles.

### **10.1 Índices descriptivos para valoración de variables**

Para medir la distribución de datos se utilizaron los siguientes índices estadísticos:

#### **10.1.1 Índices descriptivos para variables cuantitativas:**

- medidas de tendencia central.- media aritmética,
- medidas de dispersión.- desviación estándar.- cuantifica la variabilidad.

Ambas se expresaron como media aritmética (desviación estándar).

#### **10.1.1.1 Representaciones gráficas.**

- Para variables cuantitativas se eligió el diagrama de barras donde se representa la media y en la que la barra de error representa el error estándar. Para este tipo de variables también se ha utilizado el gráfico de tipo caja –boxplot-, donde se representan la mediana, los cuartiles 25, 75 en los bordes de las cajas y los percentiles 10 y 90 representados por una línea vertical. Los valores que están por encima o por debajo de estos percentiles se representan como puntos discretos.
- Para datos pareados, se ha utilizado un gráfico de líneas múltiples donde cada línea representa el valor obtenido para un paciente. En el eje de la izquierda se representa el valor al inicio del estudio (antes de IT) y en el eje de la derecha el valor al final del estudio (después de IT).

#### **10.1.1.2 Técnicas estadísticas para comparación de variables.**

Para la comparación estadística de variables, se adoptaron los métodos propuestos por Fisher en que se establece como mínimo intervalo de confianza (IC) el 95%, despreciando el 2,5% de cada una de las dos colas -5% total- de las distribuciones muestrales. Según esto para los test estadísticos de variables, se ha utilizado como grado de significación estadística un valor de  $p < 0,05$

- Comparación de valores antes y después de inmunoterapia:
- t de Student Fischer.- cuando ambas muestras no contradicen el supuesto de normalidad, obtenido mediante el test de Shapiro-Wilks,
- U de Mann Whitney.- cuando alguna muestra vulnera el supuesto de normalidad. Para datos independientes (casos/controles).
- Prueba de Wilcoxon para datos pareados (antes/después).

#### **10.1.2 Variables categóricas.**

Se realizó el test de  $\chi^2$  de Pearson para la comparación de las razones obtenidas.

Para los análisis estadísticos se utilizaron los programas: SigmaStat 3.5 (Point Richmond, Calif., USA) y [www.openepi.com](http://www.openepi.com)

## **IV. RESULTADOS**



## 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS INDIVIDUOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO.

De los pacientes que acudieron a nuestra consulta en el periodo descrito un total de 139 pacientes cumplieron los criterios de inclusión.

Treinta y seis fueron incluidos en el grupo placebo y 103 en el grupo activo.

De los 139 pacientes, 73 fueron varones y 66 mujeres (edad media  $32.3 \pm 9.6$  años).

Las características de la población, síntomas y otras sensibilizaciones se describen en la Tabla 5. El ratio de porcentajes de rinitis/asma bronquial fue de 22/78 en el grupo activo frente a 78/22 en el grupo control.

	Casos (n=103)	Controles (n=36)	$\chi^2$ , p
Edad (años)/SD	32.45±9.66	31.92±9.58	NS
Sexo: varón/mujer (%varones)	54/49 (52,4%)	19/17 (52,8%)	NS
Rinoconjuntivitis	23(22)	28(78)	<0.001
Rinoconjuntivitis y asma bronquial	80(78)	8(22)	<0.001
<i>Cupressus arizonica</i>	34(33)	16(44)	NS
<i>Olea europaea</i>	52(50)	22(61)	NS
<i>Platanus acerifolia</i>	12(12)	2(6)	NS
<i>Salsola kali</i>	20(9)	10(28)	NS
<i>D. pteronyssinus</i>	3(3)	2(6)	NS
<i>Alternaria tenuis</i>	11(11)	11(31)	<0.05
Epitelios de perro y gato	29(28)	14(39)	NS
<b>Monosensibilización a</b> <i>Phleum pratense</i>	26(25)	4(11)	NS

**Tabla 5:** Características generales, datos clínicos y sensibilización a neumoaérgenos de la población. Los datos se muestran como valores± desviación estándar o “n” con porcentajes entre paréntesis. NS:no significativo

En apartado anterior de material y métodos ya se describe como se repartieron los

pacientes en los grupos de tratamiento (cuatro grupos con diferentes pautas de tratamiento con inmunoterapia en cuanto al agrupamiento de las dosis y el periodo estacional en el que se administra) por lo que no incidiré de nuevo en estos datos.

Después del tratamiento con inmunoterapia 122 pacientes completaron el protocolo 97 del grupo activo (94,17%) y 25 del control (69,44%).

Seis del grupo activo y 11 del control abandonaron el estudio. De ellos dos por motivos económicos, uno por un cuadro depresivo mayor no acudiendo más a consulta, y el resto por pérdida de interés en continuar.

Ningún paciente abandonó el estudio por efectos adversos del tratamiento.

## **2. PRUEBAS CUTÁNEAS**

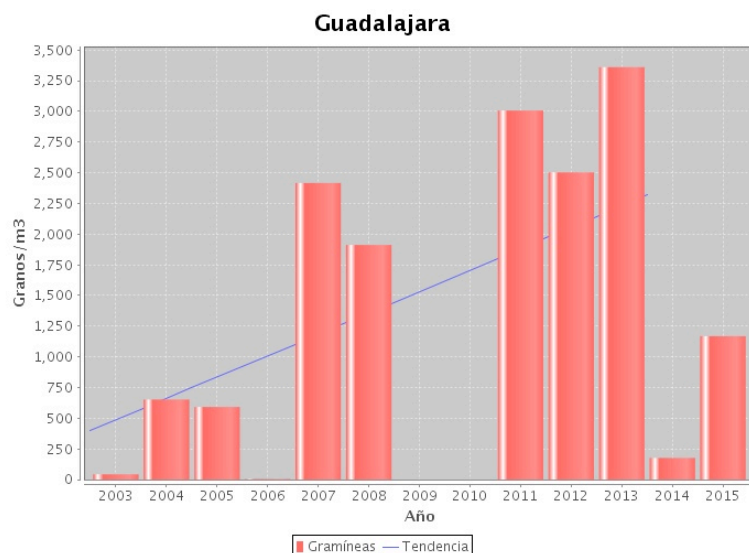
Todos los pacientes presentaron pruebas cutáneas positivas para gramíneas (*Pleum pratense*) estando monosensibilizados exclusivamente a estas el 25% de nuestra población.

La sensibilización a *Olea europea* y *Cupressus arizónica* fueron las más relevantes junto a gramíneas, estando esto en concordancia con lo observado en nuestra área geográfica.

También destaca un alto porcentaje de sensibilización a epitelios de perro y gato. Las diferentes sensibilizaciones se describen más pormenorizadas en la Tabla 5.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo activo y el control con respecto a la sensibilización a pólenes.

Los niveles de polinización de gramíneas en la provincia de Guadalajara se muestra en la Figura 13.



**Figura 13.** Histórico de niveles de polen de gramíneas en Guadalajara. Tomado de seaic.org. Niveles ambientales de polen. Comité de Aerobiología SEAIC. El dato de 2009 fue 2144 granos/mm<sup>3</sup> obtenido de Red de Aerobiología de Castilla-La Mancha (red AEROCAM). Del 2010 no obtuvimos datos. La línea azul muestra la tendencia de polinización de los últimos años.

### 3. ESTUDIO *in vitro* IgE ESPECÍFICA FRENTE A ALÉRGENOS DE *Phleum pratense*.

Los resultados del estudio *in vitro* de la IgE específica frente a los distintos alérgenos de *Phleum pratense* los estructuraremos de la siguiente manera. Primero los resultados obtenidos en cada uno de los cuatro grupos de estudio, posteriormente comparando los grupos intra y extraestacionales y los grupos con administración semanal vs mensual. Finalmente los resultados obtenidos en toda la población de estudio.

#### 3.1 Perfil de sensibilización por grupos.

##### 3.1.1 Grupo 1.

Los resultados de sensibilización del grupo de pacientes a los que se administró la inmunoterapia mensual fuera de la estación polínica se muestran en las Figuras 14 y 15.

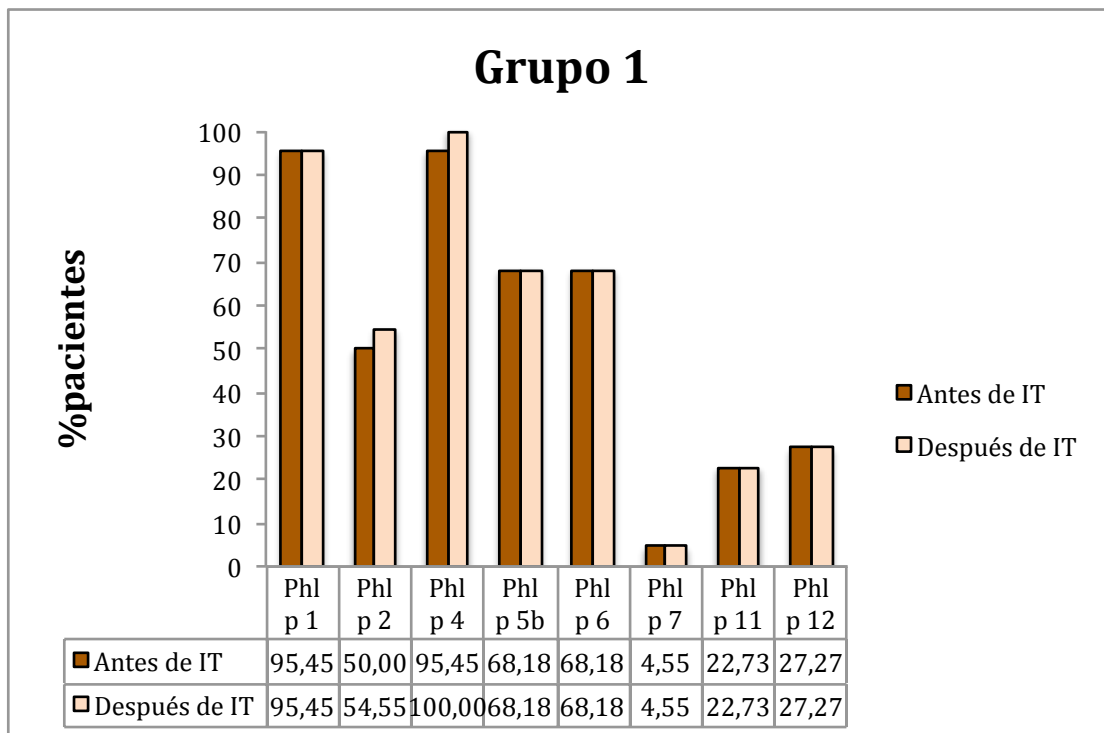


Figura 14. Perfil de sensibilización del grupo 1 en porcentaje.

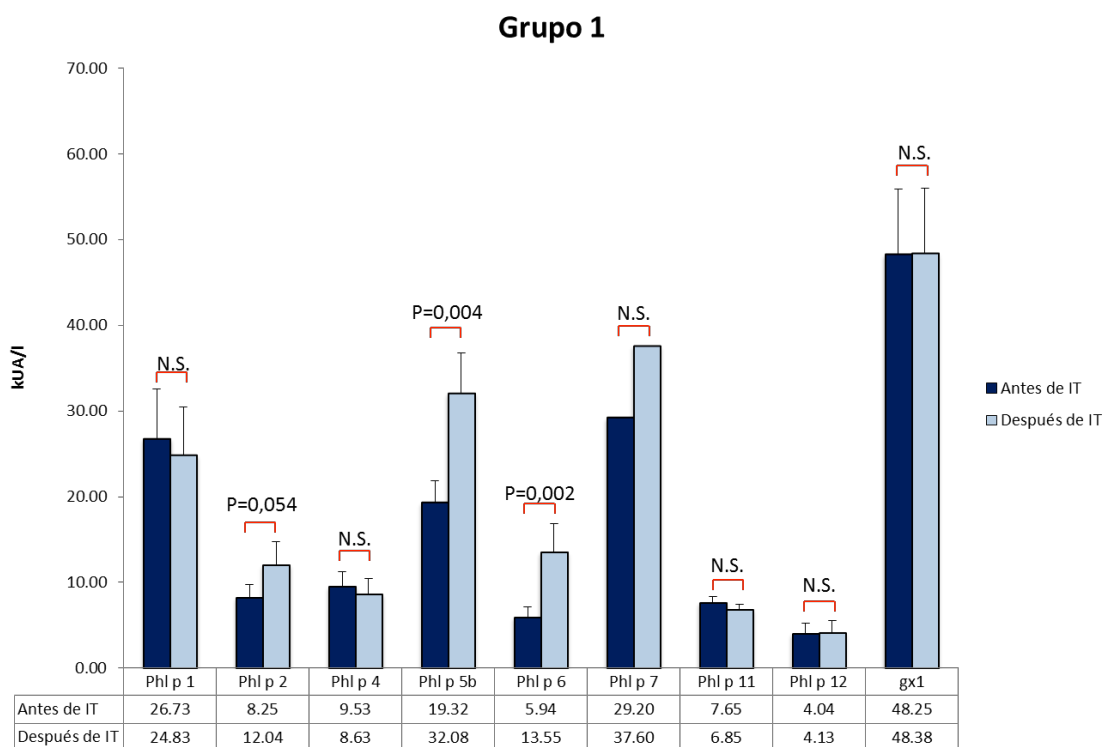


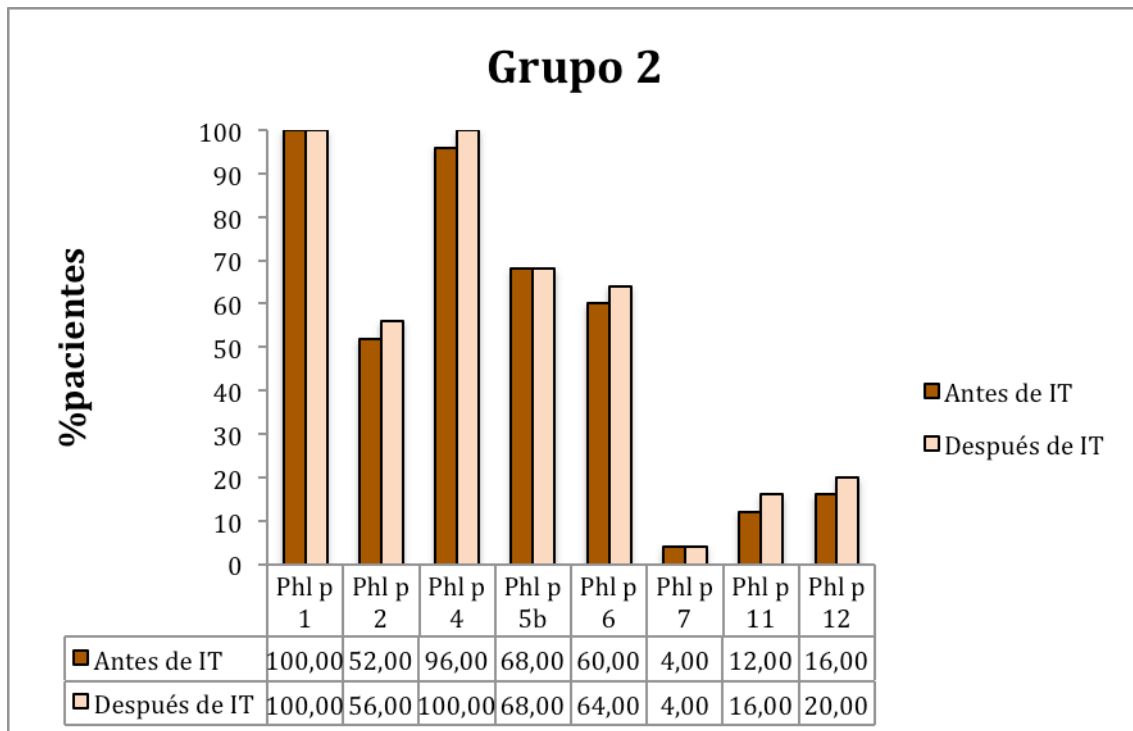
Figura 15. Perfil de sensibilización del grupo 1 valor absoluto en kU/l.

La mayor prevalencia de sensibilización se observó para Phl p 1 y Phl p 4 con un 95,4% de los pacientes en ambos casos. También se observó reconocimiento frecuente para el Phl p 5b (68,18%).

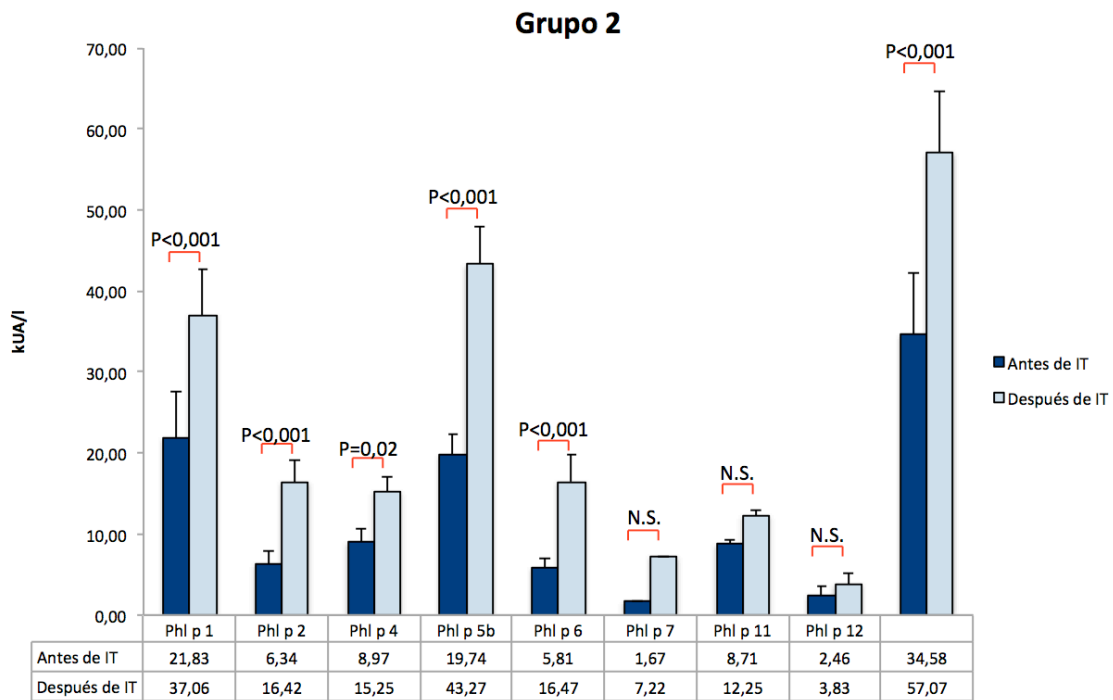
Con respecto a los valores de sensibilización los más elevados fueron para Phl p 1 (26,73 kU/l), Phl p 5b (19,32 kU/l) y Phl p 7 (29,20 kU/l).

### 3.1.2 Grupo 2.

Los resultados de este grupo (administración mensual intraestacional) se muestran resumidos en la Figuras 16 y 17.



**Figura 16.** Perfil de sensibilización del grupo 2 en porcentaje.



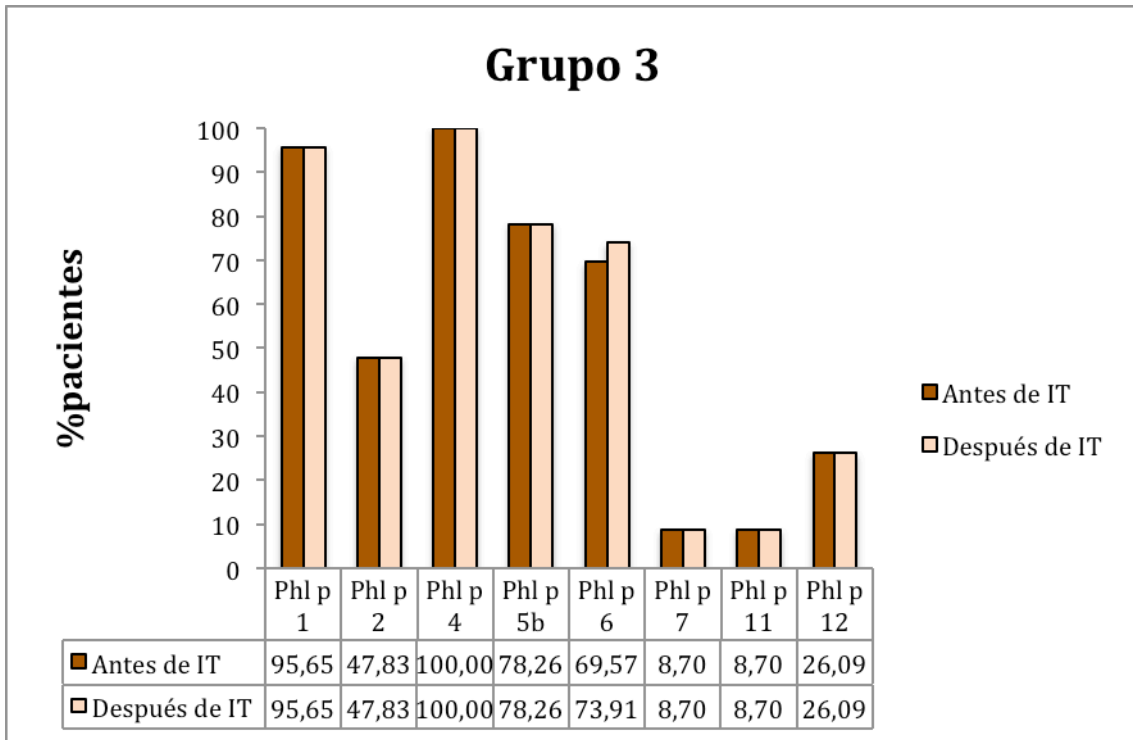
**Figura 17.** Perfil de sensibilización del grupo 2 valor absoluto en kU/l.

Los mayores porcentajes de sensibilización en este grupo fueron para Phl p1 (100%), Phl p 4 (96%) y Ph l p 5b (68%).

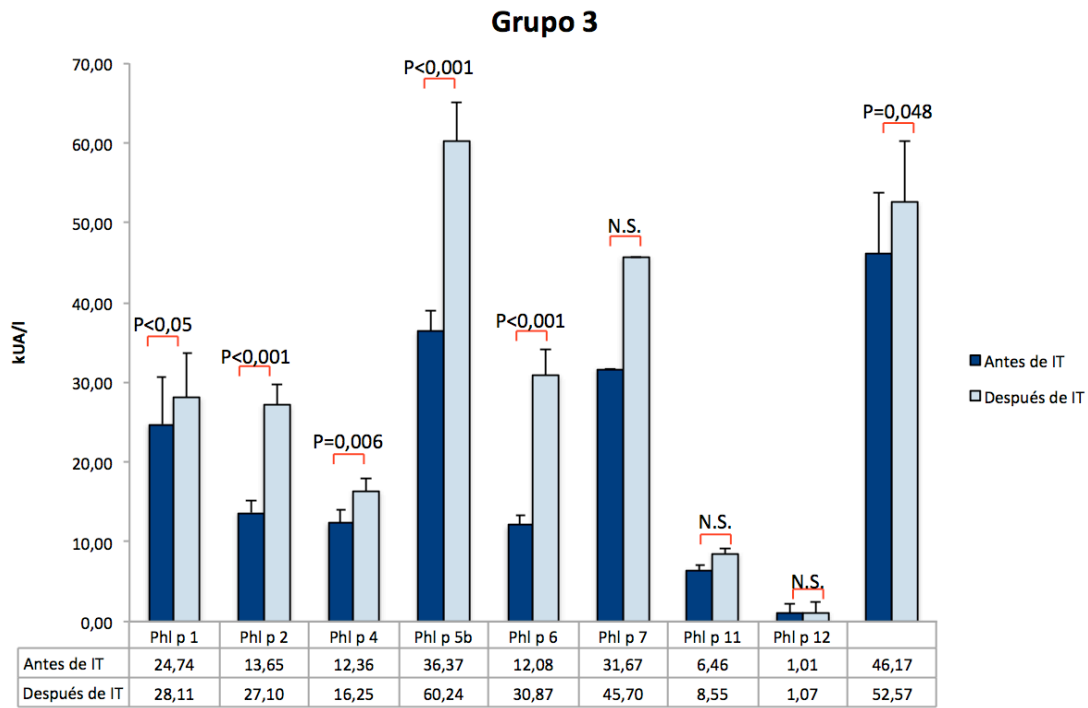
En valores absolutos Phl p 1 (21,83 kU/l) y Phl p 5b (19,74 kU/l).

### 3.1.3 Grupo 3.

Grupo de administración semanal fuera de la estación polínica, los datos se muestran en las Figuras 18 y 19.



**Figura 18** Perfil de sensibilización del grupo 3 en porcentaje



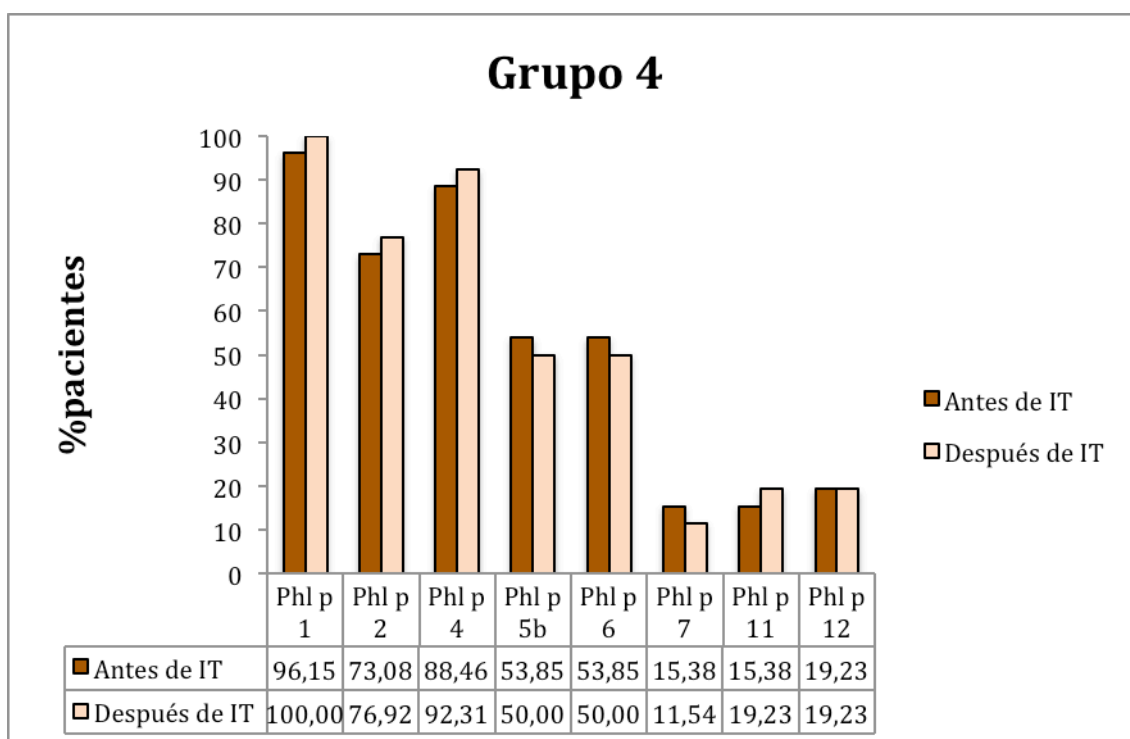
**Figura 19.** Perfil de sensibilización del grupo 3 valor absoluto en kU/l.

En este grupo como en los anteriores los mayores porcentajes correspondieron a Phl p 1 (95,65%), Phl p 4 (100%) y Phl p 5b (78,26%).

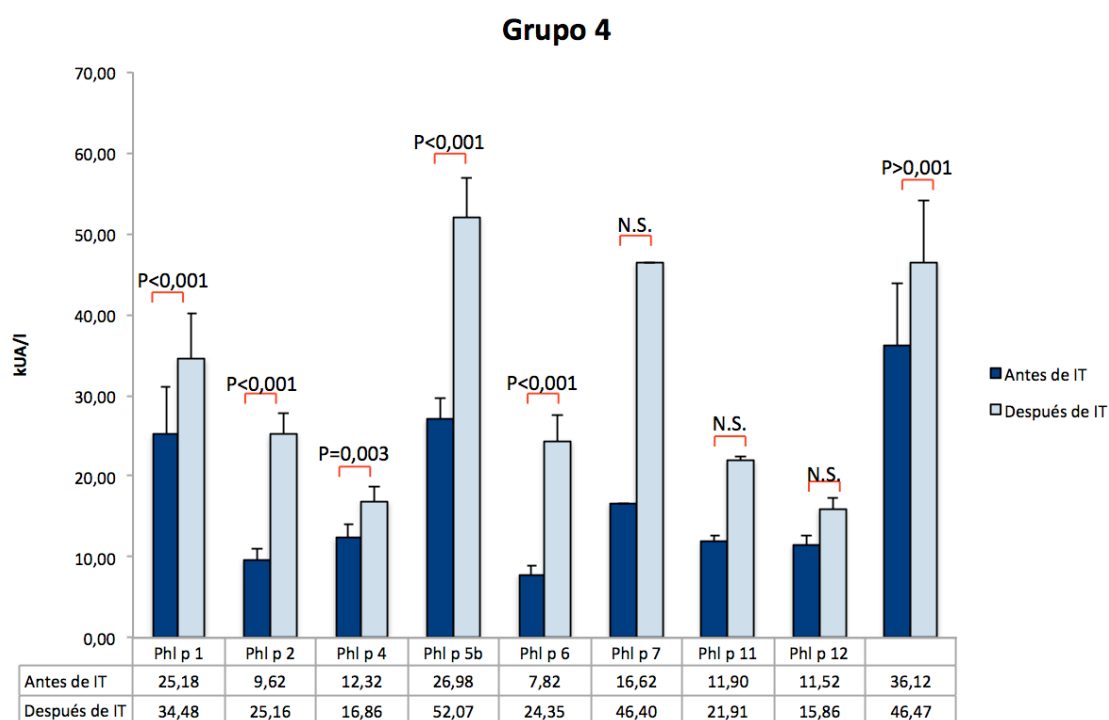
En cuanto a valores en KU/l los más elevados han sido Phl p 5b (36,37 kU/l), Phl p 7 (31,67%) y Phl p 1 (24,74%).

### 3.1.4 Grupo 4.

En este último grupo en el que administramos la inmunoterapia semanal intraestacional obtuvimos los siguientes resultados, Figuras 20 y 21.



**Figura 20.** Perfil de sensibilización del grupo 4 en porcentaje.



**Figura 21.** Perfil de sensibilización del grupo 4 valor absoluto en kU/l.

En porcentajes destacaron Phl p 1 (96,15%), Phl p 4 (88,46%) y Phl p 2 (73,08%) y en valores absolutos Phl p 5b (26,98%) y Phl p 1 (25,18 kU/l).

### 3.2. Comparativa de parámetros *in vitro* entre todos los grupos estudiados

Se realizó un análisis estadístico (Mann-Whitney Rank Sum Test) comparando los datos de IgE, IgG<sub>4</sub> y el ratio IgE/IgG<sub>4</sub> entre los 4 grupos del estudio y con el grupo control.

Se observaron diferencias significativas para los valores de IgE e IgG<sub>4</sub> entre los grupos 1, 2 y 3 y los controles.

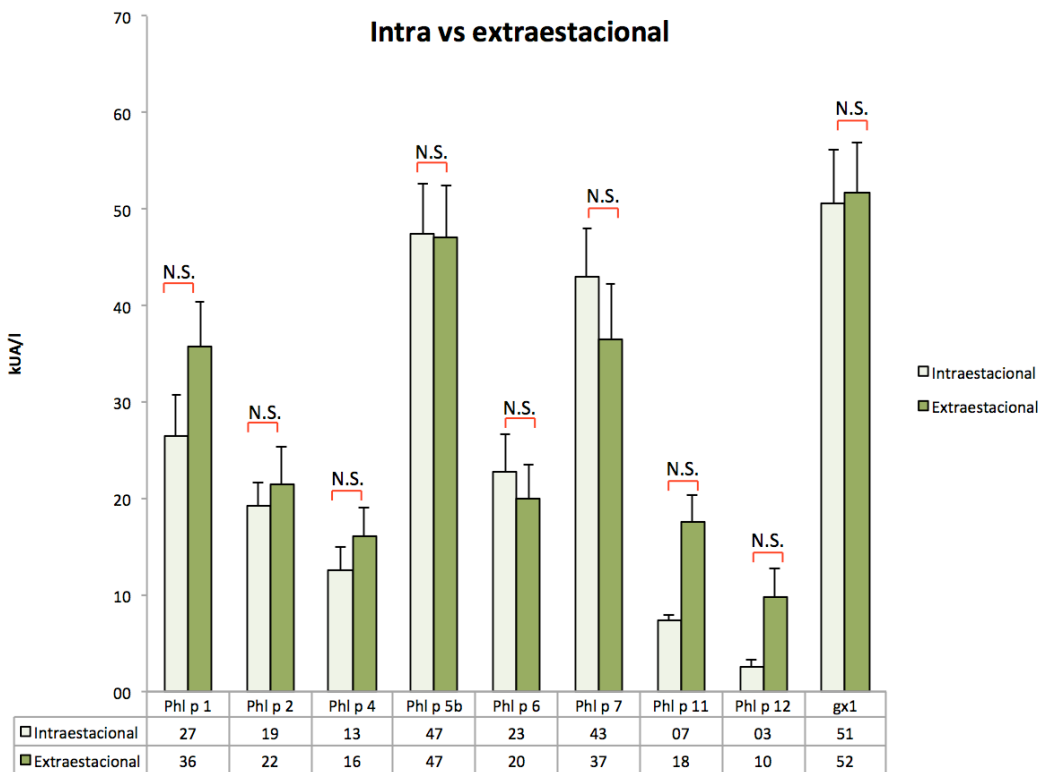
No se observaron diferencias significativas entre los grupos activos para ninguna de las variables estudiadas. (Tabla 6).

		IgE				
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controles
IgG4	Grupo 1		NS	NS	NS	p=0.017
	Grupo 2	NS		NS	NS	P = <0,001
	Grupo 3	NS	NS		NS	p=0.015
	Grupo 4	NS	NS	NS		NS
	Controles	p=0.003	p=0.006	P = <0,001	NS	

**Tabla 6.** Comparativa entre todos los grupos estudiados. (Ig E, IgG<sub>4</sub> y significación estadística)

### 3.3 Comparativa de sensibilización entre los grupos intra y extraestacional.

Los resultados obtenidos al comparar los grupos intraestacionales (2 y 4) vs los grupos extraestacionales (1 y 3) se muestran en la Figura 22.



#### Después de IT

**Figura 22.** Comparativa de grupos intra y extraestacionales. (se muestran comparados la media de los valores)

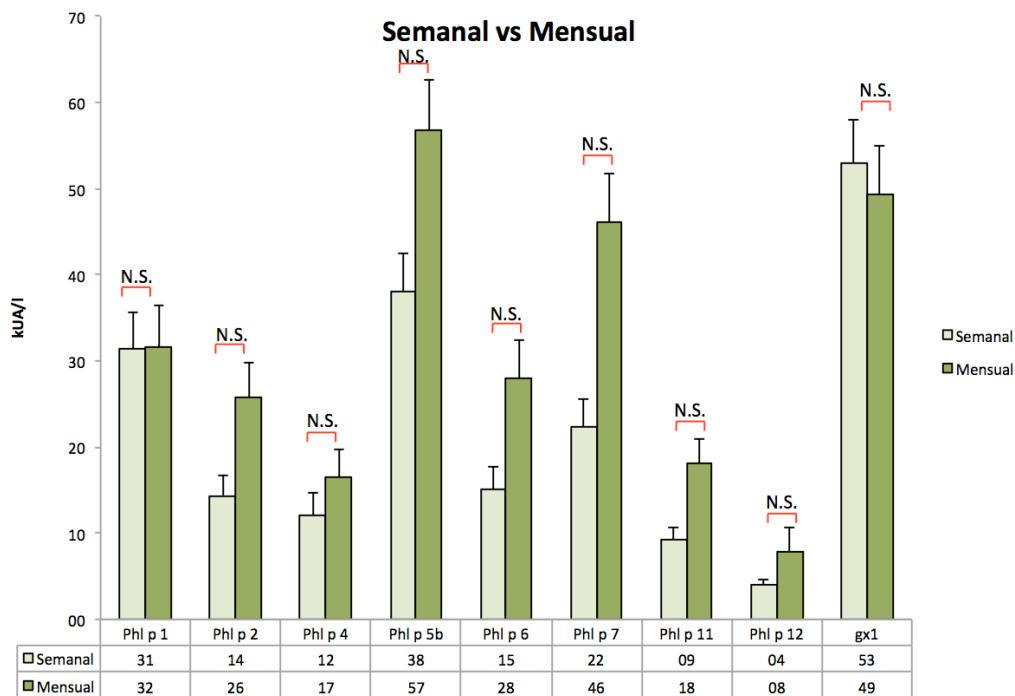
No objetivamos resultados estadísticamente significativo con ninguno de los alérgenos

cuando comparamos ambos grupos antes y después de inmunoterapia.

Solo encontramos diferencias significativas de los alérgenos con respecto a los controles. Del Phl p 5b y 6 del grupo intraestacional y de Phl p 1 y 5b del extraestacional con respecto en ambos casos a los controles pero no entre ambos grupos.

### 3.4 Comparativa de sensibilización entre los grupos de administración de la inmunoterapia semanal vs mensual.

En esta comparativa (grupos 1,2 vs 3,4) tampoco hemos encontrado datos estadísticamente significativos con ningún alérgeno en la comparación antes y después de inmunoterapia Figura 23.



#### Después de IT

**Figura 23.** Comparativa de grupos semanal vs mensual. (se muestran comparados la media de los valores)

Al igual que ocurría en la anterior comparativa solo tuvimos diferencias significativas

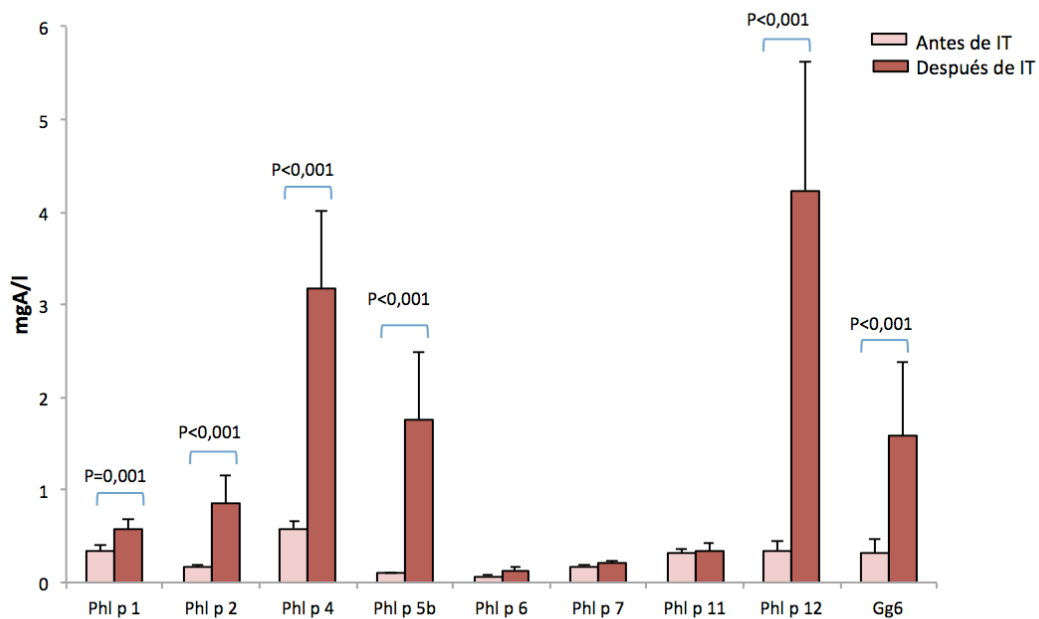
cuando comparamos los grupos con los controles en este caso el Phl p 1 en el grupo semanal con respecto a los controles y con el Phl p 5b y 6 en el grupo mensual con respecto igualmente a los controles.

### 3.5 Resultados obtenidos en toda la población de estudio.

#### 3.5.1 Respuesta IgG<sub>4</sub> e IgE antes y después de inmunoterapia en la población.

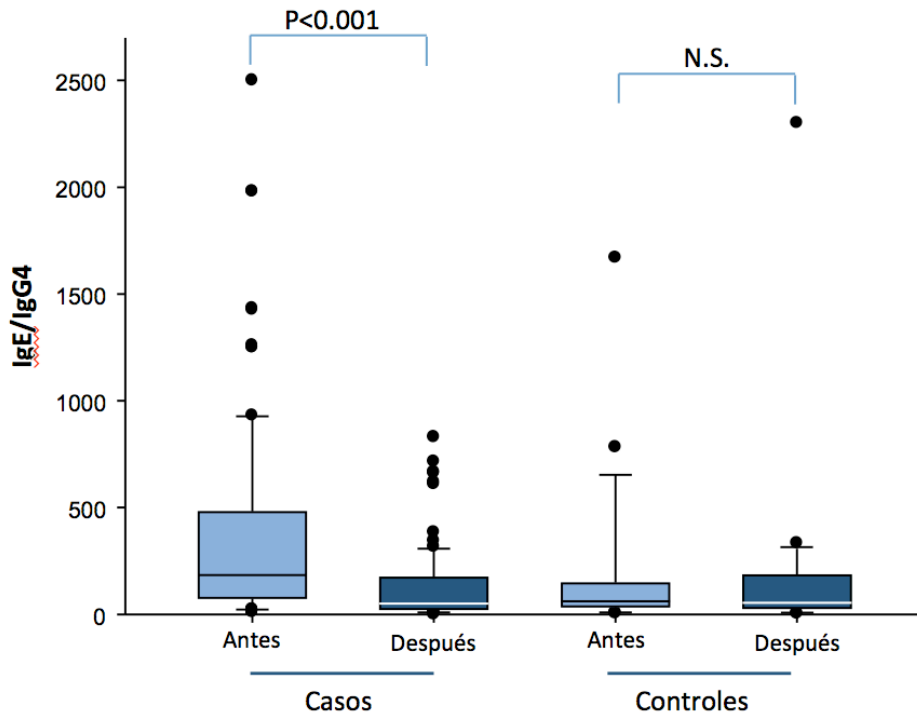
Los niveles de IgG<sub>4</sub> específica para *Phleum pratense* se incrementaron significativamente ( $p < 0.01$ ) después del tratamiento (de 0.3 a 1.6 mgA/l).

Observamos un aumento estadísticamente significativo en IgG<sub>4</sub> ( $p < 0.01$ ) para los alérgenos Phl p 1, 2, 4, 5b y 12. (Figura 24).



**Figura 24.** IgG<sub>4</sub> antes y después de inmunoterapia para los alérgenos individuales y para el extracto completo de *Phleum pratense* (Gg6).

El ratio IgE/IgG<sub>4</sub> descendió significativamente para todos los alérgenos después de recibir la inmunoterapia, esto no se observó en los controles. (Figura 25)



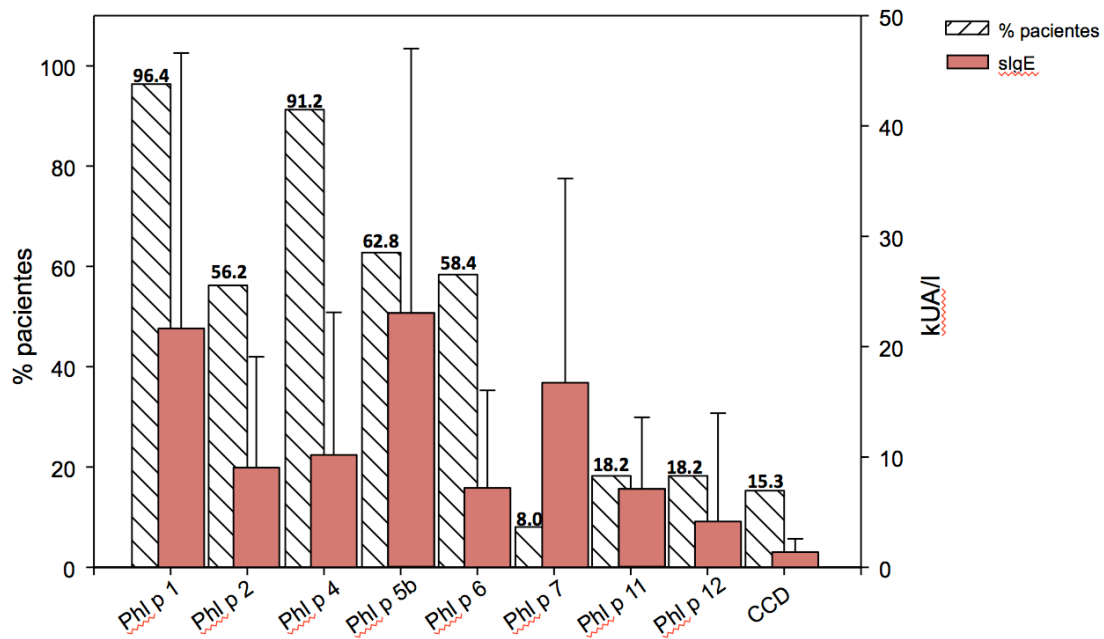
**Figura 25.** Ratio IgE/IgG<sub>4</sub> antes y después de inmunoterapia en casos y controles. Se indican las diferencias significativas.

### 3.5.2 Perfil de sensibilización de la población.

Los porcentajes de pacientes sensibilizados a diferentes alérgenos se describe en la Tabla 18. Phl p 1 y Phl p 4 son los más prevalentes siendo reconocidos en el 96.4 y 91.2 % respectivamente.

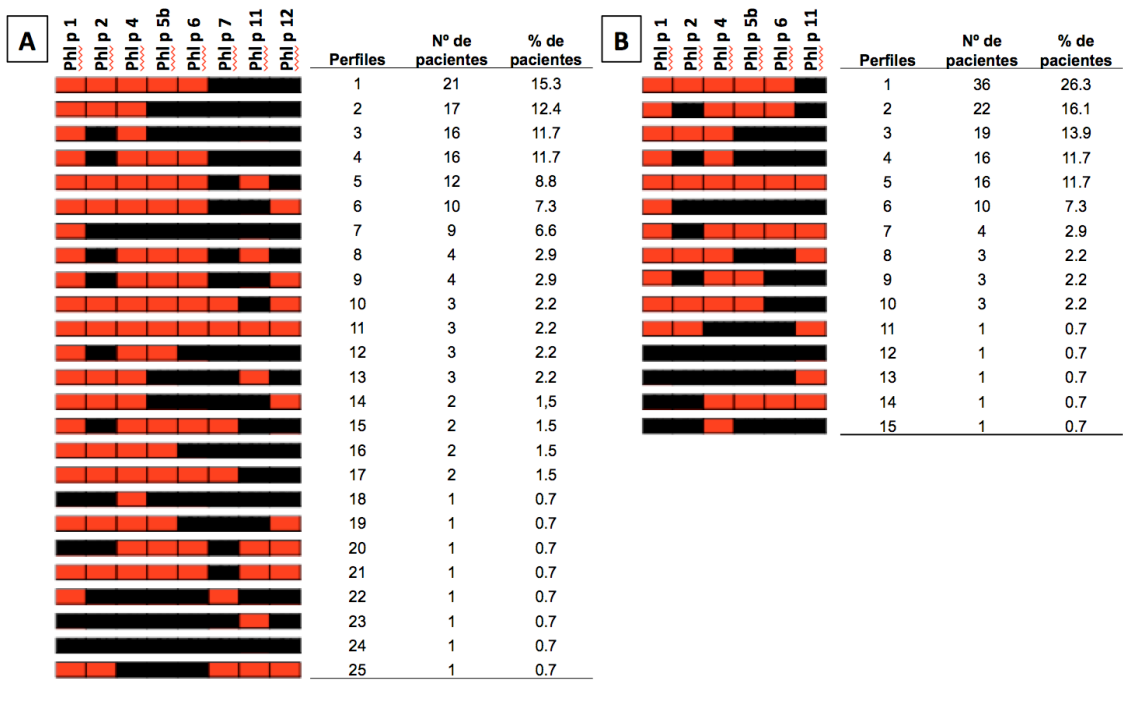
Phl p 5b fue reconocido por el 68.2% de nuestros pacientes. Resulta significativo que el 15.3% de nuestros pacientes tengan IgE positivo para CCDs (carbohidratos).

Con respecto a los niveles de sensibilización, los valores más elevados se obtuvieron para Phl p 1 ( $21.7 \pm 24.9$  kUA/l) y Phl p 5b ( $23.0 \pm 24.0$  kUA/l; Figura 26).



**Figura 26.** Porcentajes de pacientes sensibilizados a cada alérgeno de *Phleum pratense* y los valores absolutos de IgE específica (kU/l). La barra de error corresponde a la desviación estandar.

Los pacientes fueron clasificados según los alérgenos a los que estaban sensibilizados. Encontramos 25 perfiles distintos cuando consideramos todos los alérgenos y 15 perfiles cuando excluimos los alérgenos responsables de la reactividad cruzada (profilinas y polcalcinas) de nuestra clasificación (Figura 27).



**Figura 27.** Perfiles de sensibilización a los alérgenos individuales de *Phleum pratense*. A.- Se incluyen los 8 alérgenos incluidos en el estudio. B.- Excluyendo los alérgenos responsables de la reactividad cruzada (polcalcinas y profilinas). Rojo: Positividad al alérgeno. Negro: Negatividad al alérgeno correspondiente. A la derecha de la tabla se representa el número de los diferentes perfiles, el número de pacientes encontrados con cada perfil y el porcentaje que representa. Los perfiles están ordenados en orden de frecuencia.

Más del 15% de los pacientes (en concreto 21) estaban sensibilizados a Phl p 1, 2, 4, 5b y 6 siendo negativos Phl p 7, 11, y 12. Sorprendentemente el 6.6% de nuestros pacientes estaban exclusivamente sensibilizados a Phl p 1.

Con respecto a la sensibilización para CCDs tal como esperábamos todos presentaron positividad para Phl p 4.

### 3.5.3 Inhibición de Phl p 4 con CCDs.

Veintiún pacientes con positividad a CCDs y 5 pacientes negativos seleccionados del grupo control se utilizaron para realizar un CAP inhibición. La concentración de bromelina para conseguir un 50% de inhibición estuvo en un rango de 4.1 a 19.4% y el

porcentaje de inhibición con 5 mg/ml, de bromelina fue del 20 al 60% (Tabla 7).

Pacientes	slgE CCD	slgE Phl p 4	inhibición 50% (mg/ml)	% inhibición con 5mg/ml
	0.5	15.3	7.3	34.7
	0.5	8.2	8.3	38.0
	0.6	13.7	8.5	29.6
	0.7	5.0	6.4	41.2
	0.6	11.1	7.3	34.0
	1.5	53.3	8.0	33.6
pacientes grupo activo CCD positivo	0.9	15.9	7.2	42.0
	3.3	91.6	6.0	44.0
	2.1	10.2	7.2	32.7
	0.6	11.2	9.8	22.3
	3.0	17.5	4.9	50.3
	4.9	30.4	4.1	47.6
	1.0	21.4	8.0	29.3
	0.6	16.3	8.0	33.3
	2.2	59.0	9.2	35.1
		0.6	3.9	4.8
Pacientes grupo control CCD positivo.	0.5	13.9	7.7	37.0
	0.4	40.7	4.6	60.0
	2.1	30.2	19.4	20.0
	2.0	36.7	9.4	31.9
	0.4	21.4	9.9	16.9
Pacientes grupo activo CCD negativo	0	26.4	11.3	25.1
	0	22.3	11.4	30.0
	0	34.2	14.8	15.1
	0	23.8	N.I.	N.I.
Control	0	21.2	11.9	26.3

**Tabla 7.** Inhibición con Bromelina. Se muestra IgE específica para CCD and Phl p 4. 50% de inhibición fue la concentración de bromelina necesaria para obtener el 50% de la inhibición en mg/ml. En la última columna se especifica el % de inhibición con 5mg/ml de bromelina. N.I. = no inhibición.

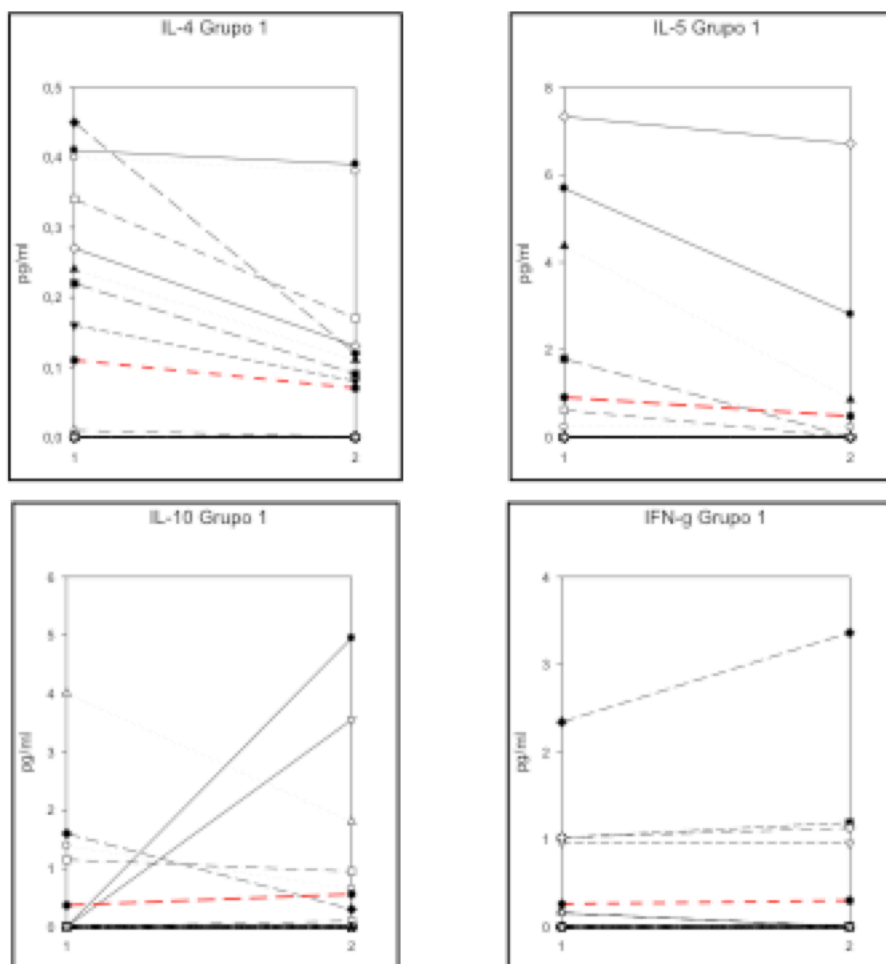
#### 4. ESTUDIO *in vitro* CON INTERLEUCINAS.

Los resultados se analizaron de una manera similar al que hemos seguido en el apartado anterior, primero resultados por grupos, y después analizaremos las distintas interleucinas comparando los grupos intra y extraestacionales.

#### 4.1 Resultados de interleucinas por grupos.

##### 4.1.1 Grupo 1.

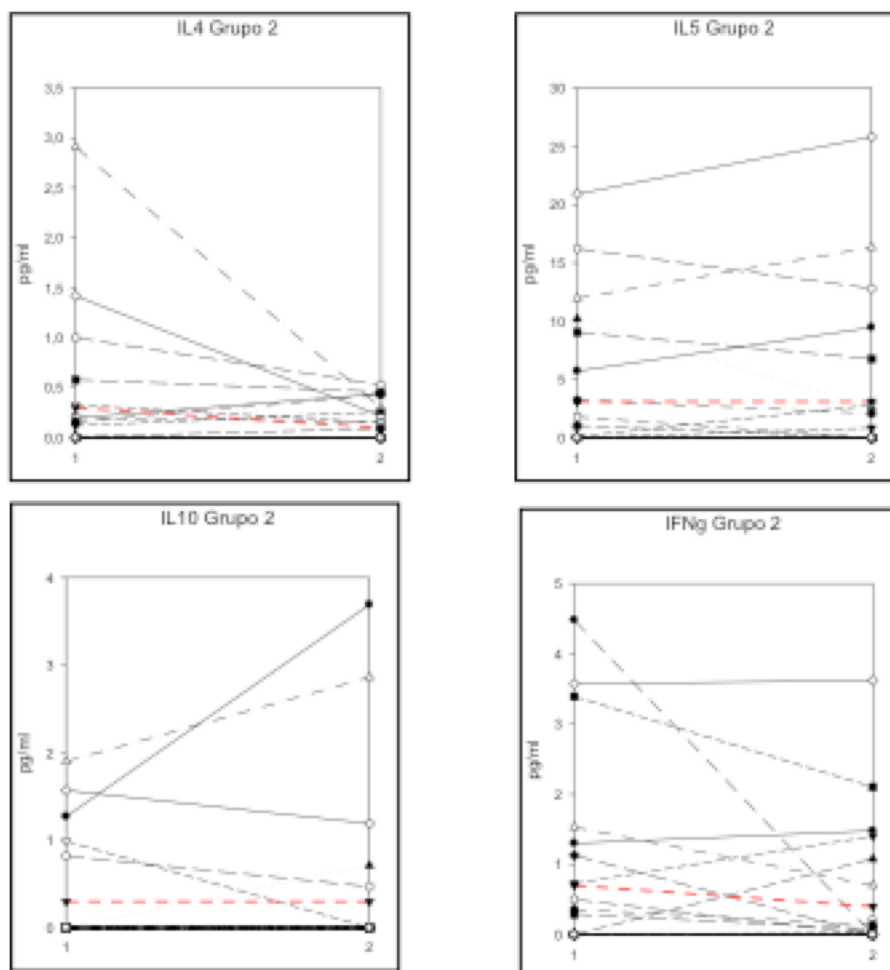
En este primer grupo en el que administrábamos la IT en dosis mensuales fuera de la estación polínica, observamos un descenso de la IL-4 y también de la IL-5 pero sin alcanzar la significación estadística. Tanto la IL-10 como el IFN- $\gamma$  presentaron pequeñas subidas no estadísticamente significativas (Figura 28).



**Figura 28.** Interleucinas grupo 1. Se representan uno a uno los valores de cada paciente, en el eje de la izquierda se representan los valores antes de la IT y a la derecha los valores después de la IT. La línea roja marca la tendencia/media de cada interleucina en este grupo de tratamiento

### 4.1.2 Grupo 2.

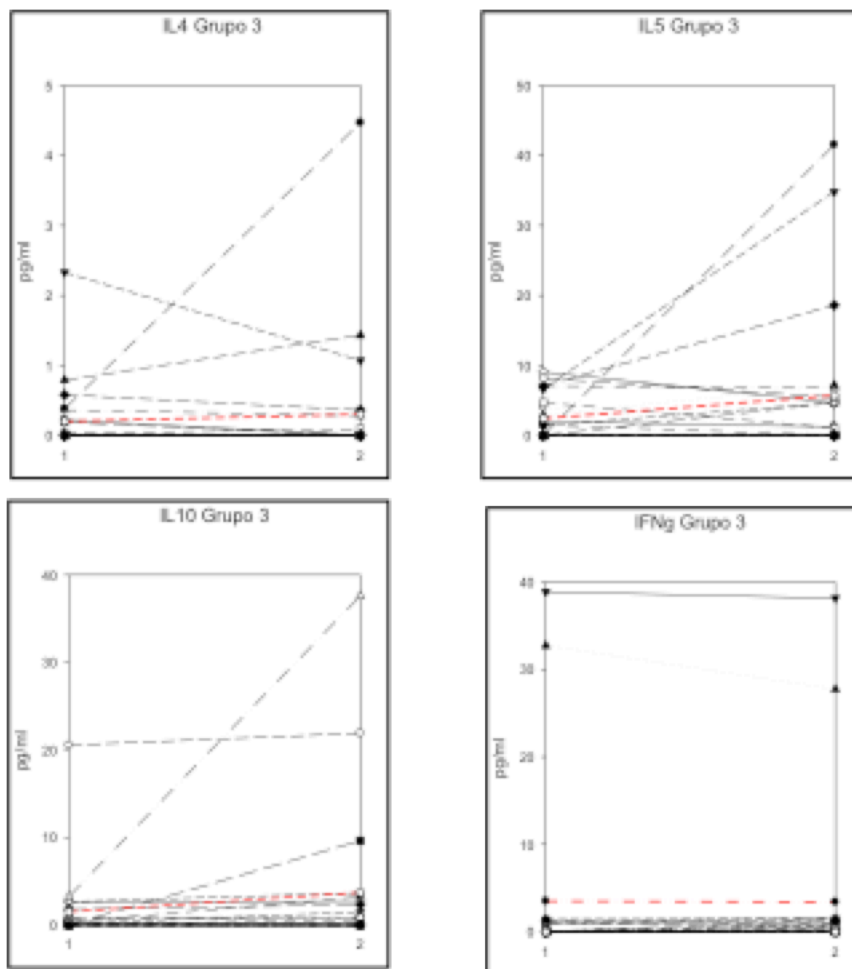
Grupo con dosis mensuales dentro de la estación polínica, no obtuvimos valores estadísticamente significativos (Figura 29)



**Figura 29.** Interleucinas grupo 2. Se representan uno a uno los valores de cada paciente. La línea roja marca la tendencia/media de cada interleucina en este grupo de tratamiento

### 4.1.3 Grupo 3.

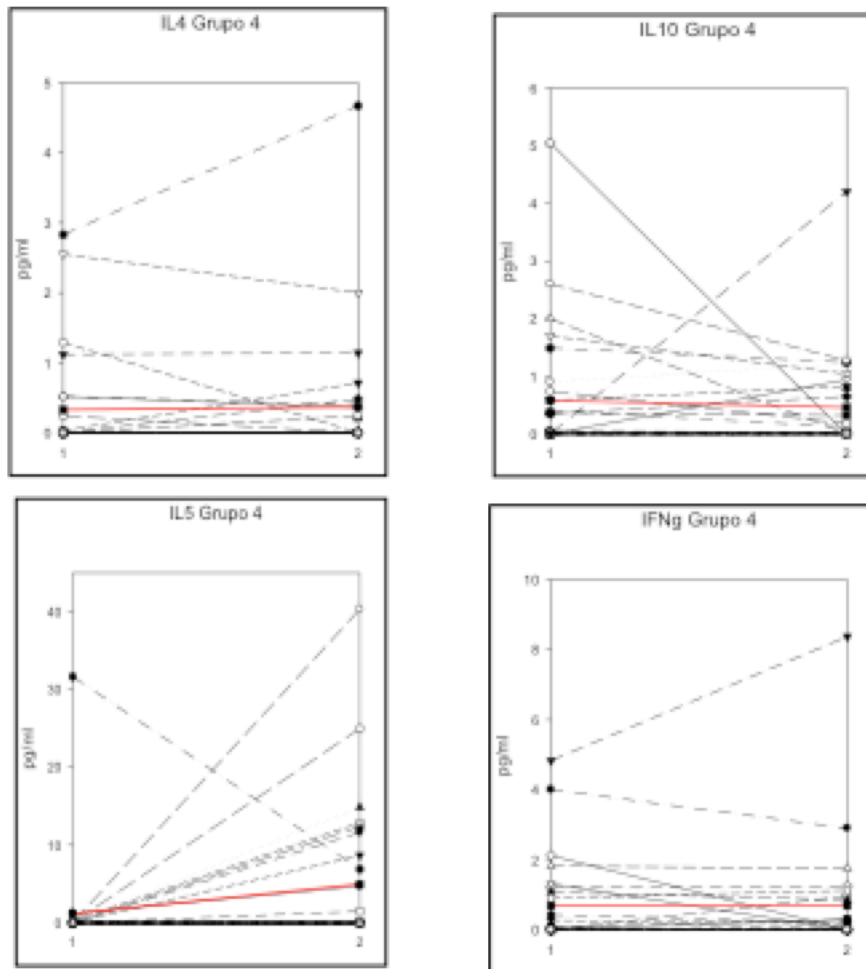
Pacientes a los que la administración de inmunoterapia fue semanal fuera de la estación polínica; presentaron una elevación de la IL-10 pero con una diferencia que no es estadísticamente significativa. Lo mismo ocurre con el resto de IL cuyos cambios no son significativos. (Figura 30)



**Figura 30.** Interleucinas grupo 3. Se representan uno a uno los valores de cada paciente. La línea roja marca la tendencia/media de cada interleucina en este grupo de tratamiento

#### 4.1.4 Grupo 4

En el grupo cuatro en el que administrábamos la IT de forma semanal dentro de la estación polínica, objetivamos una elevación de la IL-5 estadísticamente significativa. Para el resto de IL los datos son muy variables y los resultados no son significativos. (Figura 31)



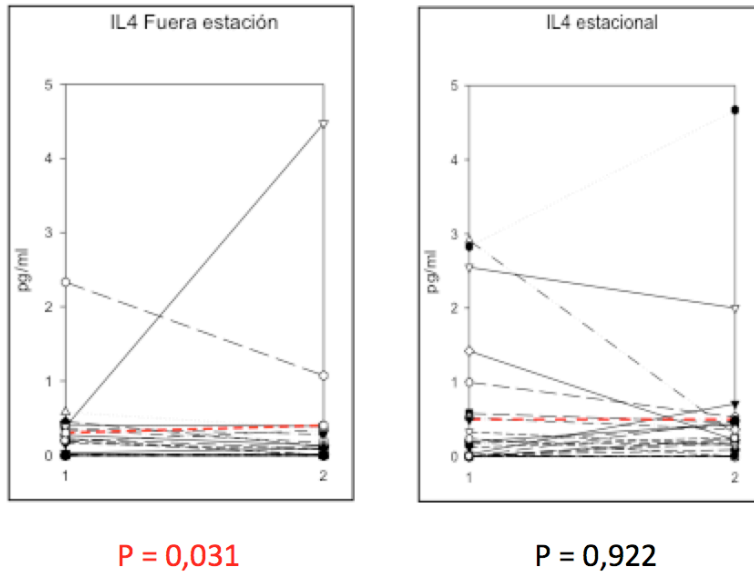
**Figura 31.** Interleucinas grupo 4. Se representan uno a uno los valores de cada paciente. La línea roja marca la tendencia/media de cada interleucina en este grupo de tratamiento

#### 4.2 Análisis de interleucinas intra y extraestacionales.

Realizamos un análisis de los resultados de las interleucinas juntando los grupos de administración de IT dentro de la estación polínica y los grupos extraestacionales, independientemente de la pauta de dosis empleada.

##### 4.2.1 IL-4

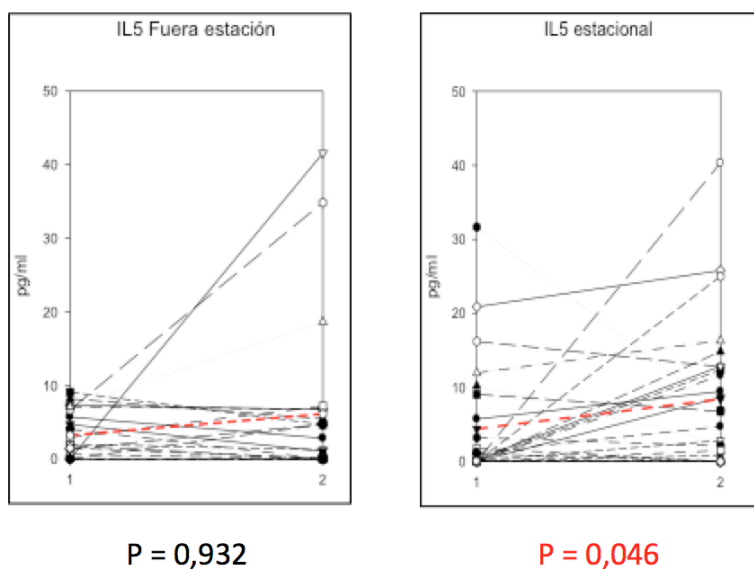
Los niveles de IL-4 en el grupo extraestacional se elevaron de media de 0.3 a 0.4 pg/ml ( $p=0.031$ ), mientras que en el grupo de administración dentro de la estación polínica no se objetivó este cambio (Figura 32).



**Figura 32.** IL-4 según periodo de administración. Se representan uno a uno los valores de cada paciente. La línea roja marca la tendencia/media de cada interleucina en este grupo de tratamiento

#### 4.2.2 IL-5

Los niveles de IL-5 se incrementaron de media de 4.4 a 8.4 pg/ml con una significación estadística positiva ( $p=0.046$ ) en el grupo estacional. Este mismo incremento se observó en el grupo de administración fuera de la estación pero en este caso sin significación estadística (Figura 33).

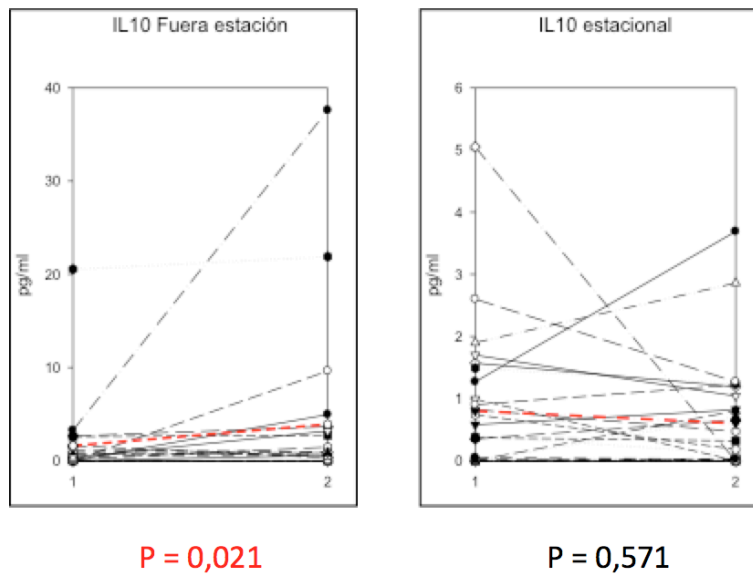


**Figura 33.** IL-5 según periodo de administración. Se representan uno a uno los valores de cada paciente.

La línea roja marca la tendencia/media de cada interleucina en este grupo de tratamiento

#### 4.2.3 IL-10

Los niveles de IL-10 se elevaron de media de 1.6 a 3.9 pg/ml ( $p=0.021$ ) en grupo extraestacional sin cambios significativos en el estacional (Figura 34).

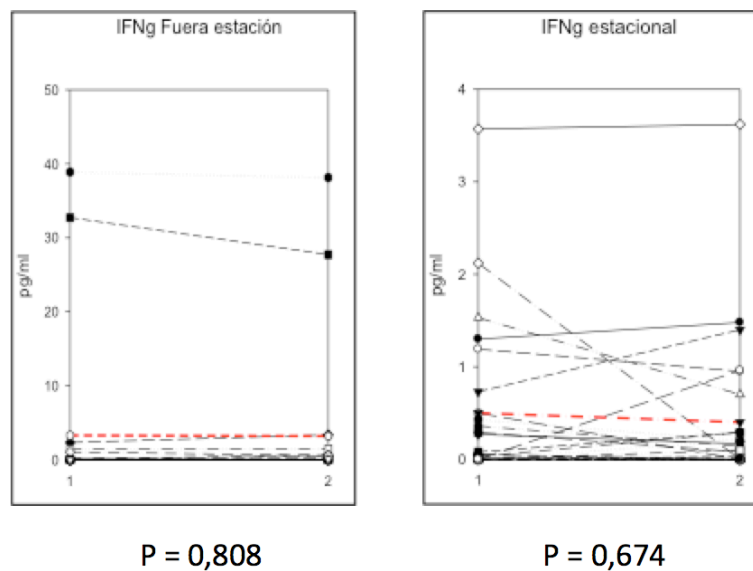


**Figura 34.** IL-10 según periodo de administración. Se representan uno a uno los valores de cada paciente.

La línea roja marca la tendencia/media de cada interleucina en este grupo de tratamiento

#### 4.2.4 IFN- $\gamma$

En ningún grupo se objetivaron valores significativos. (Figura 35)





con buena tolerancia del resto del protocolo.

El otro a las 24h presentó un angioedema palpebral derecho (Grado2) son otros síntomas; cedió sin tratamiento en unas horas. Igualmente se premedicó en las siguientes dosis con Ebastina 10 mgr con perfecta tolerancia del resto de las dosis.

## **V. DISCUSIÓN**



La rinoconjuntivitis alérgica es un problema de salud mundial que afecta entre un 10 y un 25 % de la población. La alergia a polen de gramíneas es una de las causas de alergia respiratoria más frecuente en los países occidentales.

El tratamiento de la alergia está basado en tres principios fundamentales: la evitación del alérgeno, el tratamiento farmacológico sintomático y la inmunoterapia. Mientras que las dos primeras disminuyen la sintomatología, tan sólo la inmunoterapia con extractos alérgicos ha demostrado ser capaz de modificar la evolución natural de esta enfermedad.

Los avances en el tratamiento con inmunoterapia ha sido notables en las últimas décadas, si bien muchos de los cambios inmunológicos inducidos están aun por dilucidar.

En el estudio que hemos realizado, analizamos el perfil molecular de una población de Guadalajara (España) alérgica a pólenes de gramíneas y la variabilidad observada tras la administración de inmunoterapia. Estos datos han sido publicados recientemente por nuestro grupo en *“Allergenic profile to Phleum pratense and immunological changes induced after grass allergen-specific immunotherapy”* Int Arch Allergy Immunol 2014;165:9-17.<sup>121</sup>

Igualmente valoramos cómo diferentes pautas de tratamiento con inmunoterapia, que varían en el momento de administración y en el intervalo, modifican las interleucinas implicadas en la respuesta inmunológica antes y después de la inmunoterapia.

Otro de los factores que analizamos y que consideramos imprescindibles en cualquier estudio con inmunoterapia fue valorar la seguridad de los tratamientos administrados.

La investigación fue diseñada como un estudio observacional. Nuestros pacientes acudieron a las consultas de la Sección de Alergología y los que cumplían los criterios de inclusión recibieron inmunoterapia con un extracto depigmentado-polimerizado de gramíneas que contenía todos los alérgenos relevantes.

Desde la introducción de la inmunoterapia por Noon en 1911<sup>122</sup> este tratamiento ha sido estudiado continuamente y se han logrado notables avances en la seguridad y en las pautas de administración.

Sin embargo, en los últimos años, los mayores progresos se han producido en la caracterización y estandarización de los extractos y la inclusión en la inmunoterapia solo de los alérgenos relevantes, lo cual redundará en una mayor eficacia. Aunque hay algunos estudios que investigan la modificación de la respuesta inmune, se conoce poco de los cambios específicos alérgeno por alérgeno.

#### **- Perfiles de sensibilización**

El diagnóstico molecular por componentes nos permite en el momento actual conocer la sensibilización de nuestros pacientes a las distintas moléculas que intervienen en su clínica. Esto resulta de vital importancia, puesto que a la hora de formular el tratamiento específico con inmunoterapia, solamente se pueden producir unas mezclas predeterminadas de moléculas debido a que los procedimientos de registro son extremadamente complejos y caros<sup>123</sup>.

Por este motivo consideramos importante realizar estudios como el nuestro que nos permitan conocer el perfil de sensibilización de nuestros pacientes para poder afinar el diagnóstico y que esto nos permita mejorar el tratamiento que realizan. Igualmente gracias a investigaciones como la nuestra podemos plantear hipótesis que nos pudieran permitir utilizar estos alérgenos como marcadores de eficacia de la inmunoterapia que administramos.

En la alergia a gramíneas se encuentran implicados numerosos alérgenos que sensibilizan a nuestros pacientes. La distribución geográfica, la exposición a diferentes especies y las características bioquímicas de las proteínas/alérgenos, hacen que la alergia a gramíneas no pueda simplificarse en unos pocos alérgenos como ocurre por ejemplo con el abedul o los ácaros.

Con este propósito nosotros realizamos una determinación de IgE específica en nuestra población, para todos los alérgenos disponibles de *Phleum pratense*.

La mayoría de nuestros pacientes están sensibilizados a Phl p 1 (96,4%) y a Phl p 4 (91,2%), seguidos por Phl p 5, Phl p 6 y Phl p 2. En un reciente estudio epidemiológico realizado por Scala et al<sup>124</sup> se analiza mediante microarray la sensibilización de una amplia población italiana a 75 moléculas alergénicas. Dentro de las distintas sensibilizaciones que encuentran nos centraremos en las relacionadas con el *Phleum*, objeto de nuestro estudio.

En sus pacientes la combinación de Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 6 es la más frecuente y ellos consideran que es la de mayor relevancia clínica. Estos resultados son casi idénticos a los obtenidos en nuestra población con la excepción del Phl p 4, que parece ser un importante alérgeno en nuestra población.

Resultados similares se obtuvieron por Rossi et al<sup>125</sup> en una población de origen italiana, con un 88,3% de los pacientes sensibilizados a Phl p 4. Sin embargo hay una particularidad significativa que debe tenerse en cuenta en esta sensibilización a Phl p 4.

Los componentes moleculares de *Phleum pratense* (ThermoFisher) son proteínas recombinantes. Si estos alérgenos han sido clonados y expresados en organismos procariotas, estos no presentarán glicosilaciones por la incapacidad de este sistema procariota de introducir la parte glicosilada en las proteínas. En consecuencia, la IgE específica para CCDs (determinantes de carbohidratos de reactividad cruzada), frecuentemente observada en pacientes alérgicos a gramíneas, no es detectada. Esto es una clara excepción en el caso del alérgeno Phl p 4, ya que el que se utiliza en el sistema de diagnóstico *in vitro* utilizado en este estudio no es una proteína recombinante sino un alérgeno natural purificado.

Phl p 4 es una glicoproteína<sup>126</sup> y, en su estado nativo, contiene fracciones de carbohidratos. Homólogos de Phl p 4 se han encontrado en otros extractos de pólenes,

como artemisia y polen de abedul, pero también en alimentos como cacahuete, manzana, apio y zanahoria<sup>127,128</sup>. La reactividad cruzada parece producirse por la presencia de CCDs. Por lo tanto, aunque en condiciones reales *in vivo* puede existir reconocimiento de CCDs en varios alérgenos, *in vitro* esto sólo puede ocurrir con Phl p 4. Por ello, para identificar la sensibilización a CCDs, decidimos incluir el test de bromelina en nuestro estudio.

Un porcentaje significativo de nuestros pacientes (15,3%) mostraron positividad a CCDs. Cuando investigamos la tasa real de pacientes sensibilizados a la fracción proteica de Phl p 4, estimamos que la tasa descendía del 91,2 % inicial al 75,9%. Estos resultados (104 pacientes; 75,9%) corresponderían a los pacientes con positividad para Phl p 4 siendo negativo la bromelina. La sensibilización a CCDs fue comprobada por inhibición con bromelina.

La inhibición con bromelina fue demostrada en todos los pacientes con CCDs positivos. En muchos casos fue necesaria más de 5 mg/ml de bromelina para obtener una inhibición del 50%.

Estos resultados son muy importantes porque, independientemente de la sensibilización a CCDs, la fracción proteica de Phl p 4 es responsable de un gran número de sensibilizaciones. Estos valores son mayores que los previamente publicados (en torno al 50%)<sup>129</sup> lo cual podría relacionarse con diferencias locales en la población de estudio. Por otra parte la inhibición de Phl p 4 con bromelina es baja (rango del 20 al 60% con concentraciones de 5 mg/ml), lo que sugiere que la contribución de CCDs es baja. Las implicaciones clínicas de estos hallazgos son todavía desconocidas y están aun por investigar.

En un estudio muy similar al nuestro de Triodi et al<sup>130</sup> investigaron el perfil molecular de sensibilización a diversas moléculas de *Phleum pratense* en una población de 200

niños en Roma (Italia). Analizaron la sensibilización de estos niños a Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5b, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 11 y Phl p 12.

Ellos encuentran un perfil de sensibilización similar al nuestro siendo el Phl p 1 el alérgeno más frecuente (>90%) seguido de Phl p 4, Phl p 5, Phl p 6 y Phl p 2. Cabe destacar no obstante que los porcentajes de sensibilización a estas otras moléculas no son tan elevadas como las nuestras, estando en el entorno del 50% de los pacientes.

La gran variabilidad de perfiles observados dificulta la posibilidad de reducir a unos pocos alérgenos la diana terapéutica de la inmunoterapia para obtener eficacia clínica e inmunológica en un amplio grupo de los pacientes alérgicos a gramíneas. Este hecho ha sido descrito en estudios previos como el comentado anteriormente de Tripodi et al en Italia y otros estudios similares en Alemania<sup>131</sup>.

A pesar de estos diferentes perfiles alérgicos sí podemos objetivar que algunos alérgenos son reconocidos por un alto porcentaje de pacientes. Es fundamental que estos alérgenos se encuentren en nuestros tratamientos de inmunoterapia.

Se han diseñado y producido alérgenos recombinantes de alta calidad y su eficacia ha sido contrastada<sup>132</sup> en un número limitado de estudios, por lo que el empleo de extractos alérgicos que contengan todos los alérgenos parece más razonable, por lo menos en lo referido a las gramíneas<sup>133</sup>, en el momento actual.

En este nivel, conseguir una correcta composición de la inmunoterapia, así como medir la cantidad de proteína y de alérgeno mayor que contiene, nos asegurará el éxito del tratamiento. En nuestro caso, seleccionamos una vacuna en la que la presencia de alérgenos relevantes fue identificada por espectrometría de masas, para asegurar la eficacia del tratamiento y conseguir un contenido de Phl p 5 de 35 µg/ml, calculado con los estándares de referencia europeos. En nuestro caso todos los alérgenos relevantes: Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 11 y Phl p 12 fueron identificados en las vacunas utilizadas.

Sin embargo, si los perfiles alergénicos pueden ser esenciales para seleccionar la inmunoterapia más adecuada, la identificación de los alérgenos más reactivos no es menos importante. Phl p1 y Phl p 5 han mostrado los valores más elevados de IgE específica en nuestra población, que incluye solo población adulta.

Estudios previos sugieren la implicación de diversos factores que pueden influir en la evolución de los perfiles de sensibilización a lo largo de la vida<sup>134</sup> como el realizado en República Checa en el que comparan los perfiles de sensibilización a Phl p 1, Phl p 5, Phl p 7, y Phl p 12 en una población infantil y una de adultos. Encuentran que la sensibilización a Phl p 1 es similar en adultos y en niños si bien los valores son mayores en niños. En las otras moléculas destacan que los adultos presentan una mayor sensibilización a Phl p 5 y los niños sin embargo a alérgenos minoritarios (Phl p 7 y Phl p 12). Es posible, como se refiere en el artículo, que se precise de una exposición prolongada a los pólenes para sensibilizarse a Phl p 5.

En un artículo reciente los autores estudiaron la variabilidad del contenido de Phl p 5 en el polen de diversas localizaciones geográficas en Europa a lo largo de 3 años consecutivos. Los autores observaron que existían diferencias entre los distintos lugares y atribuyeron estos cambios a factores ambientales como los niveles de polen, la humedad, la contaminación<sup>135</sup>

#### **-Marcadores *in vitro*.**

Según los perfiles de alérgenos de nuestra población, el nivel de sensibilización y la composición de la inmunoterapia, nos planteamos valorar la eficacia *in vitro*, y ver si el tratamiento suponía un incremento de IgG<sub>4</sub> específica para los alérgenos individuales. Está descrito que la elevación de anticuerpos IgG persiste años después de finalizar el tratamiento con inmunoterapia<sup>136</sup>, si bien este hecho no tiene un valor predictivo sobre el grado y duración de la eficacia de la inmunoterapia<sup>137</sup>.

Los niveles de IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>4</sub>, e IgA se incrementan durante la inmunoterapia. Ninguno de estos cambios se correlaciona consistentemente con la mejora clínica de los pacientes.

La IgG<sub>4</sub> se ha sugerido como un buen marcador de eficacia en diferentes estudios aunque no todos los pacientes presentan estas modificaciones<sup>138,139,140</sup>. Por este motivo, además de IgG<sub>4</sub>, intentamos establecer el ratio IgE/IgG<sub>4</sub>, para intentar mejorar la correlación con la eficacia clínica.

Nosotros consideramos que este ratio sí podría considerarse un buen marcador de eficacia y en nuestro estudio los valores de IgG<sub>4</sub> específica para todos los alérgenos de *Phleum pratense* se incrementaron, siendo significativo para Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5b y Phl p 12. Igualmente el ratio IGE/IgG<sub>4</sub> descendió significativamente para todos los alérgenos después de la administración de inmunoterapia. Estos cambios están en correlación con lo anteriormente expuesto.

Se han detectado anticuerpos IgG frente a nuevos epítopos inducidos por inmunoterapia<sup>141,142</sup> y anticuerpos IgG<sub>4</sub> *in vitro* capaces de bloquear células mastocitarias y mediadores de basófilos, que se producen durante la reacción alérgica<sup>143</sup>. Actualmente hay otros marcadores que están cobrando una enorme relevancia en este campo, como las citoquinas (IL4, IL5, IL10)<sup>144</sup> claramente implicadas en la cascada alérgica. En nuestro estudio intentamos relacionar los cambios en las interleucinas como posible marcador de eficacia y poder correlacionarlo con los cambios comentados anteriormente. Abordaremos este tema más detenidamente más adelante.

Nuestro estudio se focalizó en los alérgenos más frecuentes Phl p 1, Phl p 4, Phl p 5, Phl p 6 y Phl p 2, donde observamos una reducción del número de perfiles y podríamos asegurar que estos alérgenos están presentes cuando administramos la inmunoterapia y que por lo tanto alcanzamos a la mayor parte de nuestra población como diana terapéutica. De hecho se ha propuesto un algoritmo para la administración de inmunoterapia basado en el diagnóstico molecular por componentes a nivel Europeo<sup>145</sup>.

La expectativa de eficacia con inmunoterapia baja cuando los pacientes están sensibilizados a panalérgenos (Phl p7 y Phl p12). En nuestra población de estudio, ninguno de los pacientes estaba exclusivamente sensibilizado a estos alérgenos. Estos panalérgenos son marcadores de reactividad cruzada con otros pólenes<sup>146</sup> y con alimentos como las frutas.

Cuando comparamos los grupos según su administración semanal vs mensual o los grupos intra y extraestacionales no encontramos diferencias significativas. Por los resultados obtenidos intuimos que lo importante es la dosis acumulativa obtenida más que el momento en el que se administre la inmunoterapia o lo agrupado que administremos nuestras dosis de tratamiento.

Igualmente realizamos una comparativa de los valores *in vitro* (IgE e IgG<sub>4</sub>) entre los cuatro grupos de estudio. No objetivamos diferencias significativas entre ellos, lo cual nos reafirma en lo anteriormente expuesto.

Con respecto a la modificación que se produce en las inmunoglobulinas tras la administración de inmunoterapia, está descrito que durante los primeros meses de tratamiento se produce un incremento en los niveles de IgE específica, como ocurre con la exposición natural al alérgeno. Posteriormente hay una fase de meseta donde no hay alteraciones significativas y, finalmente, un descenso progresivo hasta alcanzar niveles inferiores a los existentes antes de empezar con el tratamiento de inmunoterapia<sup>147</sup>. Los cambios en los niveles de IgE no siempre son concordantes con la eficacia clínica. En nuestro estudio se observa una respuesta de todas las moléculas similar a la descrita

#### **-Estudio de interleucinas.**

Las citoquinas Th2 han sido investigadas con anterioridad en pacientes con rinitis alérgica, fundamentalmente el papel de la IL4 y la IL-13. La IL-4 es el pilar central de la respuesta inflamatoria alérgica y la respuesta de Th2.

La IL-4 y la IL-13 promueven la síntesis de IgE, el reclutamiento y diferenciación de los eosinófilos, la activación de basófilos y mastocitos y la hipersecreción de moco e hiperreactividad de la vía aérea.<sup>148</sup>

Las citoquinas Th1, fundamentalmente IFN- $\gamma$ , IL-12 y IL-2, se encuentran habitualmente inhibidas durante la respuesta alérgica.

Durante la inmunoterapia se producen cambios en las células T helper CD4+, desplazando la producción de interleuquinas Th2 (especialmente IL4) hacia citoquinas Th1 (IFN- $\gamma$ ); la elevación de los niveles de IL-12 facilita este cambio hacia una respuesta Th1<sup>149</sup>.

Esto nos debería llevar a observar una disminución de IL4, IL5 y a un incremento de IFN- $\gamma$ . Como consecuencia final habría cambios en el cociente de TH1/TH2.

Hay que tener en cuenta sin embargo que estas células Th1 en algunos casos pueden ser proinflamatorias y estar en el fondo de algunas exacerbaciones asmáticas. El incremento de la patología atópica en los últimos 20 años ha sido asociada a un incremento en la prevalencia de las enfermedades autoinmunes asociadas a Th1.

La IL 10 tiene una importancia capital en la respuesta alérgica, modulando la IL 4, que actúa sobre las células B, favoreciendo la síntesis de IgG4 en lugar de IgE. También reduce las citoquinas proinflamatorias liberadas por mastocitos, eosinófilos y células T<sup>150</sup>.

Desafortunadamente en nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en las interleuquinas estudiadas, aunque sí visualizamos una tendencia por grupos.

Observamos la misma tendencia que los estudios previos con un descenso de interleucinas Th2 (IL4) y una elevación de las Th1 (IFN- $\gamma$ ), salvo en el grupo 4 que la IL5 en contra de lo esperable se eleva ( $p=0,046$  en el grupo de administración intraestacional). Con respecto a la IL10 observamos una elevación que concuerda con lo descrito previamente.

Intentamos comparar los resultados de las interleucinas entre los grupos de tratamiento y ver si había diferencias en las mismas según el momento que comenzáramos la inmunoterapia, dentro o fuera de la estación polínica o con pautas semanales vs mensuales. Tal y como ocurre con el análisis de los grupos por separado no obtuvimos diferencias significativas y los resultados con las distintas citoquinas son muy variables. En nuestro estudio tratamos de estudiar la evolución en los perfiles de citoquinas en el suero. Para ellos seleccionamos aquellas que están directamente implicadas en la respuesta Th1, Th2 y de células reguladoras. En este caso, hicimos un tratamiento especial del suero para conservar intacto el contenido de las citoquinas.

Hoy en día es reconocido que los niveles de citoquinas en el suero son variables y las técnicas puestas a punto para ello pueden dar resultados variables debido a la concentración de las mismas. Decidimos estudiar este método con el objetivo de poder tener un sistema de cuantificación real, tratando de optimizar el sistema ELISA.

En los últimos años la determinación de citoquinas ha evolucionado claramente a poder cuantificarlas en extractos celulares. Aunque este sistema no da una medida real de las citoquinas que se producen, si son un buen sistema comparador entre dos grupos de poblaciones. Los sistemas de cultivos celulares permiten obtener PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de los pacientes. Estos cultivos son entonces estimulados con el alérgeno/alérgenos a los que el paciente está sensibilizado o ha sido tratado. Las células entonces se activan y liberan grandes cantidades de mediadores y citoquinas. Estas pueden ser directamente recogidas en los sobrenadantes de los cultivos y ser analizadas mediante kits de ELISA. En nuestro sistema empleamos estos mismos kits pero tratamos de identificar su presencia en el suero para obtener medidas reales.

Desafortunadamente no conseguimos establecer un método robusto y de ahí que los resultados nos muestren únicamente la tendencia. Los sistemas celulares han evolucionado mucho y se les considera buenos sistemas marcadores. Sin embargo estos

sistemas son muy sensibles y presentan también una gran variabilidad entre cultivos.

Los valores reales no pueden extrapolarse a la presencia *in vivo*.

Sin duda, el desafío de poder medir marcadores directamente en suero sigue existiendo.

Los cultivos celulares se muestran cómo una posible alternativa, pero la logística que acompaña es compleja.

#### **-Seguridad.**

Solo presentamos tres efectos adversos , en uno de los casos con una muy dudosa relación con la administración de la inmunoterapia. Los dos casos que sí consideramos claramente relacionados con la administración de la inmunoterapia continuaron el protocolo sin más incidencias realizando pretratamiento con antihistamínicos en dosis posteriores. Por todo esto podemos concluir que se trata de un tratamiento seguro que podemos administrar en cualquier momento del año.

Tras finalizar nuestro estudio, la cuestión fundamental es si estos perfiles de sensibilización que hemos obtenidos nos van a servir para mejorar el tratamiento que administramos y en segundo lugar si a la hora de administrar inmunoterapia estas moléculas van a alcanzar las mismas dianas que el extracto nativo. En nuestro estudio obtuvimos un número elevado de perfiles moleculares distintos lo cual dificulta conseguir estos objetivos. Sin embargo demostramos que todos los alérgenos a los que están sensibilizados los pacientes están presentes en las vacunas utilizadas.

Estudios como el nuestro en diferentes áreas geográficas son importantes para analizar las posibles similitudes o no, entre los diferentes perfiles moleculares.

Aunque la mejoría en la calidad de vida y la reducción de los síntomas son las variables más importantes para definir el éxito de la inmunoterapia, los estudios preliminares *in vitro*, nos pueden ayudar a personalizar los tratamientos, a través de un adecuado diagnóstico del paciente y una correcta selección de las vacunas, que contengan los

alérgenos relevantes en la clínica de nuestros pacientes, lo cual nos asegurará el éxito de esta importante arma terapéutica de la que disponemos.

## **VI. CONCLUSIONES**



- 1.- La mayoría de nuestros pacientes están sensibilizados a Phl p 1 (96,4%) y a Phl p 4 (91,2%), seguidos por Phl p 5, Phl p 6 y Phl p 2.
- 2.- Phl p 4 es utilizado en el CAP como un alérgeno natural purificado, el resto son recombinantes (no glicosilados). El 75,9% de nuestros pacientes presentó una sensibilización a la fracción proteica de Phl p 4 lo que supone una proporción muy significativa en nuestra área geográfica (valoración clínica en estudio).
- 3.- Los valores de IgG<sub>4</sub> específica para todos los alérgenos de *Phleum pratense* se incrementaron en nuestros pacientes, siendo significativo para Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5b y Phl p 12. Igualmente el ratio IGE/IgG<sub>4</sub> descendió significativamente para todos los alérgenos después de la administración de inmunoterapia. Consideramos estos resultados como un posible marcador de eficacia.
- 4.- No se objetivaron diferencias significativas *in vitro* entre los grupos de estudio. Los resultados obtenidos nos llevan a pensar que la eficacia de la inmunoterapia a largo plazo no estaría relacionada con el tiempo más o menos agrupado de la administración sino con las dosis individuales y las concentraciones máximas que se pueden alcanzar
- 5.- Los resultados obtenidos en las interleucinas muestran una tendencia de respuesta, con desviación del sistema Th2 hacia Th1, pero sin resultados significativos.
- 6.- Tratamiento seguro con un índice de reacciones adversas bajo independientemente del momento estacional o lo agrupado que administremos las dosis de inmunoterapia.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



## **Bibliografía.**

---

1. Valero Santiago A, Cadahía García A. Polinosis, Polen y Alergia. 123.
2. Sanico AM, Koliatsos VE et al. Neural hyperresponsiveness and nerve growth factor in allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118:154-158.
3. Mannino D, Homa D et al. Surveillance of asthma-United States 1980-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002; 51:1-13.
4. Guerra S, Sherrill D, Martínez F, Barbee R. Rhinitis as a independent risk factor for adult-onset asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 419-25.
5. Gaga M, Lambrou P et al. Eosinophils are a feature of upper and lower airway pathology in non.atopic asthma, irrespective of the presence of rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2000;30:663-9.
6. Cibella F, Cuttitta G, La Grutta S et al. Bronchial hyperresponsiveness in children with atopic rhinitis:a 7-year follow-up. *Allergy* 2004; 59:320-6.
7. National Heart Lung and Blood Institute N. Global strategy for asthma management and prevention. NHBLI/WHO workshop. 1995: NIH Publication no. 95-3659.
8. Corren J, Manning BE, Thompson SF et al. Rhinitis therapy and the prevention of hospital care for asthma: a case-control study. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:415-9.
9. Saltoun CA. Update on efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinitis and asthma. *Allergy Asthma proc* 2002; 23:377-86.
10. Holgate, S. T., Church, M (1993). *Allergy*Gower medical Publishing. Londres
11. Van Ree, R. e. a. (1996). False-Positive Skin-Prick Test Responses to Commercially Available Dog-Dander Extracts Caused by Contamination with House Dust Mite (*Dermatophagoides Pteronyssinus*) Allergens. *J Allergy Clin Immunol*98:1028–1034
12. Valenta, R. e. a. (1991). Identification of Profilin as a Novel Pollen Allergen; IgE Autoreactivity in Sensitized Individuals. *Science* 253:557–560

- 
13. Hiller, R. e. a. (2002). Microarrayed Allergen Molecules: Diagnostic Gatekeepers for Refined Allergy Treatment. FASEB J Jan 14 (DOI 10.1096/fj.01-0711fje).
  14. Belmonte Soler J, Roure Nola JM. Introducción en : Polinosis. Editores: Luis Valero A, Cadahía Garcia. Edición: mra ediciones S.L. 2002: 7-16
  15. Centro, resultados regionales. En: Sastre J y col eds. Alergológica. Madrid: SEAIC- Alergia e Inmunología Abelló. 1994:21-25
  16. Izco J. Madrid verde. Madrid: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación- Comunidad de Madrid, 1984.
  17. Subiza J, Jerez M, Jimenez JA et al. Allergenic pollen and pollinosis in Madrid. J Allergy Clin Immunol 1995;96:15-23
  18. Izco J. Madrid verde. Madrid: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación- Comunidad de Madrid, 1984.
  19. Subiza J, Jerez M, Jimenez JA et al. Allergenic pollen and pollinosis in Madrid. J Allergy Clin Immunol 1995;96:15-23
  20. Subiza J, Jerez M, Gavilán M<sup>a</sup>J, Varela S, Rodriguez R, Narganes M<sup>a</sup>J, Jiménez J.A, Tejada Cazorla J et al. ¿Cuáles son los pólenes que producen polinosis epidémica en el medio urbano de Madrid?. Rev. Esp Alergol Inmunol Clin 1998;13:107-119.
  21. Subiza J, Jerez M, Rodríguez R, López G. Gramíneas. En: Polinosis. Polen y alergia. MRA Ediciones, S.L. 2002. p. 25-40
  22. Andersson K, Lidholm J. Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. Int Arch Allergy Immunol. 2003; 130:87-107.
  23. Montero MT, López C, Jiménez JA, Subiza J. Characterization of allergens from *Trisetum pniceum* pollen: an important aeroallergen in Mediterranean continental climatic areas. Clin Exp Allergy. 1997;12: 1442-8

- 
24. Valenta R, Vrtala S, Ebner C, Kraft D, Scheiner O. Diagnosis of grass pollen allergy with recombinant timothy grass ( *Phleum pratense*) pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;97:287-94
25. Mecheri S, Peltre G, David B. Purification and characterization of a major allergen from *Dactylis glomerata* pollen: the Ag Dg1. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985;78:283-9
26. OMS
27. Curtis HH. The immunity cure of hay fever. *Med News (New York)*1900;77:16-9.
28. Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 1911;i:1572-3.
29. Prausnitz C, Kustner H. Studien ueber die verbering findlichkeit. *Zentrabl Bakteriol Parasitenk Infectionskr Hyg abt* 1921;1:86,160.
30. Cooke RA, Barnard J, Hebald S, Stull A. Serological evidence on immunity with co-existing sensitization in a type of human allergy, hay fever. *J Exp Med* 1935;62:733-50.
31. Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM. Physico-chemical properties of human reaginic antibody.IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J Immunol* 1966;97:75-85.
32. Bohle B, Kinaciyan T, Gerstmayr M, Radakovics A, Jahn-Schmid B, Ebner C. Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Sep;120(3):707-13.
33. Allam JP, Novak N, Fuchs C, Asen S, Berge S, Appel T, et al. Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive FcεRI expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112:141–148.
34. Rossi RE, Monasterolo G. Evaluation of recombinant and native timothy grasspollen (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].

35. Flicker S, Valenta R. Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy.

*Int Arch Allergy Immunol* 2003; 132: 13–24

36. Canonica GW, and Passalacqua G. Noninjection routes for immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 111; 437-448, 2003.

37. Brunet C, Bédart PM, Lavoie A, Jobin M, Hébert J. Allergic rhinitis to ragweed pollen II. Modulation of histamine-releasing factor production by specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 1992; 89: 87-94

38. Nopp A, Cardell LO, Johansson SG, Oman H. CD-sens: a biological measure of immunological changes stimulated by ASIT. *Allergy*. 2009; 64: 811-4

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

40. Passalacqua G, Albano M, Riccio A et al. Clinical and immunologic effects of a rush sublingual immunotherapy to parietaria species: A double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 104: 964-8.

41. 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: 647-653

42. Radulovic S, Jacobson MR, Durham SR, Nouri-Aria KT. Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 121: 1.467-1.472

43. Ozdemir C. An immunological overview of allergen specific immunotherapy – subcutaneous and sublingual routes. *Ther Adv Respir Dis* 2009; 3: 253-262

- 
44. Burgler S, Ouaked N, Bassin C, Basinski TM, Mantel PY, Siegmund K, Schmidt-Weber CB. Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123: 588-95, 595.e1-7
45. Mascarell L, Lombardi V, Louise A, Saint-Lu N, Chabre H, Moussu H, Betbeder D, Balazuc AM, Van Overtvelt L, Moingeon P Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+ T cells.. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Sep;122(3):603-9
46. Wheeler AW, Drachenberg KJ. New routes and formulations for allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 1997;52(6):602-12.
47. Gieni RS, Yang X, Kelso A, Hayglass KT. Limiting dilution analysis of CD4 T-cell cytokine production in mice administered native versus polymerized ovalbumin: directed induction of T-helper type-1-like activation. *Immunol* 1996;87(1):119-26.
48. Hayglass KT, Stefura WP. Antigen-specific inhibition of ongoing murine IgE responses. II. Inhibition of IgE responses induced by treatment with glutaraldehyde-modified allergens is paralleled by reciprocal increases in IgG2a synthesis. *J Immunol* 1991;147(8):2455-60.
49. Yang X, Gieni RS, Mosmann TR, HayGlass KT. Chemically modified antigen preferentially elicits induction of Th1-like cytokine synthesis patterns in vivo. *J Exp Med* 1993;178(1):349-53.
50. Norman PS, Winkenwerder WL, D'Lugoff BC, Tignall J. Controlled evaluations of respiratory therapy in ragweed hay fever. *J Allergy* 1967;39(2):82-92.
51. Ishizaka K, Okudaira H, King TP. Immunogenic properties of modified antigen E. II. Ability of urea-denatured antigen and alpha-polypeptide chain to prime T cells specific for antigen E. *J Immunol* 1975;114(1 Pt 1):110-5.

- 
52. King TP, Kochoumian L, Ishizaka K, Lichtenstein LM, Norman PS. Immunochemical studies of dextran coupled ragweed pollen allergen, antigen E. Archives of Biochemistry and Biophysics 1975;169(2):464-73.
53. King TP, Kochoumian L, Chiorazzi N. Immunological properties of conjugates of ragweed pollen antigen E with methoxypolyethylene glycol or a copolymer of D-glutamic acid and D-lysine. Journal of Experimental Medicine 1979;149(2):424-35.
54. King TP, Kochoumian L, Lichtenstein LM. Preparation and immunochemical properties of methoxypolyethylene glycol-coupled and N-carboxymethylated derivatives of ragweed pollen allergen, antigen E. Archives of Biochemistry and Biophysics 1977;178(2):442-50.
55. King TP, Weiner C. Immunologic properties of conjugates of ragweed antigen E with various alkoxypolyethylene glycols. International Archives of Allergy and Applied Immunology 1981;66(4):439-46.
56. King TP, Kochoumian L, Ishizaka K, Lichtenstein LM, Norman PS. Immunochemical studies of dextran coupled ragweed pollen allergen, antigen E. Archives of Biochemistry and Biophysics 1975;169(2):464-73.
57. King TP, Norman PS, Tao N. Chemical modifications of the major allergen of ragweed pollen, antigen E. Immunochemistry 1974;11(2):83-92.
58. Hendrix SG, Patterson R, Zeiss CR, Pruzansky JJ, Suszko IM, McQueen RC, et al. A multi-institutional trial of polymerized whole ragweed for immunotherapy of ragweed allergy. J Allergy Clin Immunol 1980;66(6):486-94
59. Pastorello EA, Pravettoni V, Incorvaia C, et al. Clinical and immunological effects of immunotherapy with alum-adsorbed grass allergoid in grass-pollen-induced-hay-fever. Allergy 1992, 47:281-90

- 
60. Tari MG, Mancino M, Ghezzi E, Frank E, Cromwell O. Immunotherapy with an alum-adsorbed Parietaria-pollen allergoid: a 2-year, double-blind, placebo-controlled study. *Allergy* 1997;52:65-74
61. Carter EB, inventor US4234569: Production of aldehyde-treated allergen-containing substances patent US Patent 2019808. 1935.
62. Stull A, Cooke RA, Sherman WB, Hebdal S, Hampton SF. Experimental and clinical study of fresh and modified pollen extracts. *J Allergy* 1940;11:439-65.
63. Marsh D. Allergens and the genetics of allergy. In: Sela M, editor. *The antigens*. Vol III. New York: Academic Press; 1975. p. 271-78.
64. Marsh DG, Lichtenstein LM, Campbell DH. Studies on "allergoids" prepared from naturally occurring allergens. I. Assay of allergenicity and antigenicity of formalinized rye group I component. *Immunology* 1970;18(5):705-22.
65. Marsh DG. Preparation and properties of ,allergoids, derived from native pollen allergens by mild formalin treatment. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1971;41(1):199-215.
66. Haddad ZH, Marsh DG, Campbell DH. Studies on "allergoids" prepared from naturally occurring allergens. II. Evaluation of allergenicity and assay of antigenicity of formalinized mixed grass pollen extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1972;49(4):197-209.
67. Bacal E, Zeiss CR, Suszko I, Levitz D, Patterson R. Poylmerized whole ragweed: an improved method of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1978;62(5):288-94.
68. Moran DM, Wheeler AW. Chemical modification of crude timothy grass pollen extract. I. Antigenicity and immunogenicity changes following amino group modification. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1976; 50:693-708
69. Yang X, Gieni RS, Mossman TR. Chemically modified antigen preferentially elicits induction of Th1-like cytokine synthesis patterns in vivo. *J Exp Med* 1993;178:349-53

- 
70. Hayglas KT, Stefura BP. Antigen-specific inhibition of IgE responses by treatment with glutaraldehyde-modified allergens is paralleled by reciprocal increases in IgG2a synthesis. *J Immunol* 1991;147:2455-60
71. Hendrix SG, Patterson R, Zeiss CR, Pruzansky JJ, Suszko IM, McQueen RC, et al. A multi-institutional trial of polymerized whole ragweed for immunotherapy of ragweed allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1980;66(6):486-94.
71. Hendrix SG, Patterson R, Zeiss CR, Suszko IM. Further studies on the safety of polymerized antigens for immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1981;67(2):124-8.
73. Hendrix SG, Patterson R, Zeiss CR, Suszko IM. Further studies on the safety of polymerized antigens for immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1981;67(2):124-8.
74. Goldfarb AR, Callaghan OH. Fractionation of the antigens from dwarf ragweed pollen. *J Immunol* 1961;86:83-90
75. Moore M, Moore M. Studies on pollen and pollen extracts. VII. A glucoside from certain grass pollens. *J Am Chem Soc* 1931;53:2744-46.
76. Wiermann R, Wollenweber E, Rehse C. "Yellow flavonols" as components of pollen pigmentation. *Z Naturforsch* 1981;36 c:204.
77. Heyl F. The yellow coloring substances of ragweed pollen. *J Am Chem Soc* 1919;41:1285-87.
78. Johnson M, Hampton S, Schiele A, Frankel S. A study of an allergenic flavonoid glycoside derived from extracts of timothy pollen. *J Allergy* 1954;25:82-85.
79. Stevens F, Moore D, Baer H. The isolation of isoquercetin from giant ragweed pollen; the electrophoretic pattern and biologic activity of the pigment. *J Allergy* 1951;22:165-76.
80. Wiermann R, Wollenweber E, Rehse C. "Yellow flavonols" as components of pollen pigmentation. *Z Naturforsch* 1981;36 c:204.

- 
81. Heyl F. The yellow coloring substances of ragweed pollen. *J Am Chem Soc* 1919;41:1285-87.
82. Harborne J, Mabry T. *The Flavonoids: Advances in Research*. London: Chapman & Hall; 1982.
83. Edwards JH, Jones BM. Pseudoimmune precipitation by the isolated byssinosis "antigen". *Journal of Immunology* 1973;110(2):498-502
84. Harborne J, Mabry T. *The Flavonoids: Advances in Research*. London: Chapman & Hall; 1982.
85. Cody V, Middleton E, Harborne JB. *Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships: Proceedings of a Symposium held in Buffalo, New York, July 22-26, 1985*. New York: Liss; 1986.
86. Cody V, Middleton E, Harborne JB. *Plants Flavonoids in Biology and Medecine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties*. New York. Alan R. Liss; 1988.
87. Foreman JC. Mast cells and the actions of flavonoids. *J Allergy Clin Immunol* 1984;73(6):769-74.
88. Middleton E, Jr., Kandaswami C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem Pharmacol* 1992;43(6):1167-79.
89. Cody V, Middleton E, Harborne JB. *Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships: Proceedings of a Symposium held in Buffalo, New York, July 22-26, 1985*. New York: Liss; 1986.
90. Cody V, Middleton E, Harborne JB. *Plants Flavonoids in Biology and Medecine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties*. New York. Alan R. Liss; 1988.
91. Middleton E, Jr., Kandaswami C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem Pharmacol* 1992;43(6):1167-79.

- 
92. Berton G, Schneider C, Romeo D. Inhibition by quercetin of activation of polymorphonuclear leucocyte functions. Stimulus-specific effects. *Biochim Biophys Acta* 1980;595(1):47-55.
  93. Beretz A, Anton R, Stoclet JC. Flavonoid compounds are potent inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase. *Experientia* 1978;34(8):1054-5.
  94. Berrens L, Bleumink E. Ultraviolet absorption of N-glycosidic (lysine-sugar) linkages. *Biochim Biophys Acta* 1966;115(2):504-7.
  95. Berrens L. The chemistry of atopic allergens. Basel, New York. S. Karger; 1971.
  96. Moore M, Moore M. Studies on pollen and pollen extracts. VII. A glucoside from certain grass pollens. *J Am Chem Soc* 1931;53:2744-46.
  97. Johnson M, Hampton S, Schiele A, Frankel S. A study of an allergenic flavonoid glycoside derived from extracts of timothy pollen. *J Allergy* 1954;25:82-85.
  98. Stevens F, Moore D, Baer H. The isolation of isoquercitin from giant ragweed pollen; the electrophoretic pattern and biologic activity of the pigment. *J Allergy* 1951;22:165-76.
  99. Roth L, Daunderer M, Kormann K. Giftpflanzen, Pflanzengifte. Landsberg/Münche: Verlag Ecomed; 1988.
  100. International Patent Application PCT. Number of Publication WO 94/06821. 1994.
  101. Patterson R: Allergen immunotherapy with modified allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1981;68:85
  102. Yang X, Gieni RS, Mosmann TR, Hayglass T. Chemically modified antigen preferentially elicits induction of Th1-like cytokine sunthesis patterns in vivo. *J Exp Med* 1993;178:349
  103. Kalinski P, Lebre MC, Kramer D, de Jong EC, van Schijndel JWPM, Kapsenberg ML. Analysis of the CD4+T cell responses to house dust mite allergoid. *Allergy* 2003; 58:648-656

- 
104. Kahler H, Grage-Griebenow E, Stüve HT, Cromwell O, Fiebig H. T cell reactivity with allergoids: influence of the type of APC. *J Immunol* 2000; 165: 1807-1815
105. Lanzavecchia A. Mechanism of antigen uptake for presentation. *Curr Opin Immunol* 1996;8:348.
106. Passalacqua G, Albano M, Fregonese L, Riccio A, Pronzato C, Mela GS, Canonica GW: Randomized controlled trial of local allergoid immunotherapy on allergic inflammation in mite-induced rhinoconjunctivitis. *Lancet* 1998;351:629-632
107. Circovic TD, Bucilica MN, Gavrovic MD, Vujcic Z, Petrovic S, Jankov RM: Phycochemical and immunologic characterization of low-molecular weight allergoids of *Dactylis glomerata* pollen proteins. *Allergy* 1999; 54: 128-134.
108. Noon L. Prophylactic inoculación against hayfever. *Lancet* 1911; 1:1572-3.
109. Norman PS, Lichtenstein LM, et al. Controlled evaluation of allergoid in the immunotherapy of ragweed hay fever. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 70:248-60.
110. Kaul S, Englert L, May S, Vieths S. Regulatory aspects of specific immunotherapy in Europe. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010;10:594-602.
111. Bousquet J, Lockey RF, Malling HJ. WHO Position Paper. Allergen immunotherapy : Therapeutics vaccines for allergic diseases. *Allergy* 1998;53(44):1-42.
112. Gleich GJ, Zimmermann EM et al. Effect of immunotherapy on immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six year prospective study. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 70:261-71.
113. Galán C, Cariñanos P, Alcazar P, Domínguez E. Manual de calidad y gestión de la Red Española de Aerobiología. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba. ISBN: 978-84-690-6354-5. 2007.
114. Skin test used in type I allergy testing Position paper. Sub-Committee on Skin Test of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1989; 44 (Suppl 10): 1-59-

- 
115. García Robaina JC, Matheu Delgado V, Sánchez Machín I, Seoane Lestón J. Técnicas diagnósticas in vivo. Tratado de alergología SEAIC 2007; 116-117.
116. Sachs DH, Winn HJ. The use of glutaraldehyde as a coupling agent for ribonuclease and bovine serum albumin. *Immunochemistry* 1970; 7 (6):581-5
117. Farid NA. Fluorescamine use in high-performance liquid chromatographic determination aminocaproic acid in serum. *J Pharm Sci* 1979;68(2):249-52
118. Lacroix C, Levert P, Laine G, Gouille JP. [Microassay of epsilon-aminocaproic acid by liquid chromatography]. *Ann Biol Clin (Paris)* 1984;42(5):371-3
119. Mailing HJ. Minimising the risk of allergen-specific injection immunotherapy. *Drug Saf* 2000; 23:323-32.
120. Domenech J. El modelo de investigación científica: Diseño de estudios. 1998. Métodos estadísticos en ciencias de la salud. Unidad 7: 7-67
121. Beitia JM, Lóez-Matas, Alonso A, Vega A, Mateo B, Cárdenas R, Carnés J. Allergenic profile to *Phleum pratense* and immunological changes induced after grass allergen-specific immunotherapy. *Int Ach Allergy Immunol* 2014;165:9-17.
122. Noon L. Prophylactic inoculación against hayfever. *Lancet* 1911; 1:1572-3.
123. Kaul S, Englert L, May S, Vieths S. Regulatory aspects of specific immunotherapy in Europe. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010;10:594-602.
124. Scala E, Alessandri C et al. Cross-sectional survey on immunoglobulin E reactivity in 23077 subjects using an allergenic molecule-based microarray detection system. *Clin Exp Allergy* 2010;40:911-21.
125. Rossi RE, Monasterolo G, Monasterolo S: Measurement of IgE antibodies against purified grass-pollen allergens (Phl p 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11 and 12) in sera of patients allergic to grass pollen. *Allergy* 2001;56:1180–1185.

- 
126. Zafred D, Nandy A, Pump L, Kahlert H, Keller W: Crystal structure and immunologic characterization of the major grass pollen allergen Phl p 4. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:696–703.
127. Stumvoll S, Lidholm J, Thunberg R, DeWitt AM, Eibensteiner P, Swoboda I, Bugajska-Schretter A, Spitzauer S, Vangelista L, Kazemi-Shirazi L, Sperr WR, Valent P, Kraft D, Valenta R: Purification, structural and immunological characterization of a timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen, Phl p 4, with cross-reactive potential. *Biol Chem* 2002;383:1383–1396.
128. DeWitt AM, Andersson K, Peltre G, Lidholm J: Cloning, expression and immunological characterization of full-length timothy grass pollen allergen Phl p 4, a berberine bridge enzyme-like protein with homology to celery allergen Api g 5. *Clin Exp Allergy* 2006;36:77–86.
129. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology: Skin tests used in type I allergy testing: position paper. *Allergy* 1989; 44(suppl 10): 1–59.
130. Tripodi S, Frediani T, Lucarelli S et al. Molecular profiles of IgE to *Phleum Pratense* in children with grass pollen allergy: Implication for specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*.
131. Darsow U, Brockow K, Pfab F, Jakob T, Petersson CJ, Borres MP, Ring J, Behrendt H, Huss-Marp J: Heterogeneity of molecular sensitization profiles in grass pollen allergy – implications for immunotherapy? *Clin Exp Allergy* 2014;44:778–786.
132. Jutel M, Jaeger L, Suck R, Meyer H, Math D, Fiebig H, Cromwell O: Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116: 608–613.

- 
133. Kaul S, Englert L, May S, Vieths S: Regulatory aspects of specific immunotherapy in Europe. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010; 10: 594–602.
134. Sekerkova A, Polackova M, Striz I: Detection of Phlp1, Phlp5, Phlp7, and Phlp12 specific Ig E antibodies in the sera of children and adult patients allergic to Phleum pollen. *AI- lergol Int* 2012;61:339–346.
135. Buters J, Prank M, Sofiev M et al (The HIALINE working group). Variation of the group 5 grass pollen allergen content of airborne pollen in relation to geographic location and time in season. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 May; 1-8
136. Wachholz PA, Durham SR. Induction of 'blocking' IgG antibodies during immunotherapy. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2003 Sep;33(9):1171-4.
137. Alvaro M, Sancha J, Larramona H, Lucas JM, Mesa M, Tabar AI, et al. Allergen-specific immunotherapy: update on immunological mechanisms. *Allergologia et immunopathologia*. 2013 Jul-Aug;41(4):265-72
138. Möbs C, Slotosch C, Löffler H, Pfutzner W, Hertl M: Cellular and humoral mechanisms of immune tolerance in immediate-type allergy induced by specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;147:171–178.
139. Bodtger U, Ejrnaes AM, Hummelshoj L, Jacobi HH, Poulsen LK, Svenson M: Is immunotherapy-induced birch pollen-specific IgG4 a marker for decreased allergen-specific sensitivity? *Int Arch Allergy Immunol* 2005;136:340–346.
140. Senna G, Calderon M, Makatsori M, Ridolo E, Passalacqua G: An evidence-based appraisal of the surrogate markers of efficacy of allergen immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011;11:375–380.
141. Gadermaier E, Flicker S, Aberer W, Egger C, Reider N, Focke M, Vrtala S, Kundl M, Valenta R: Analysis of the antibody responses induced by subcutaneous injection

---

immuno- therapy with birch and Fagales pollen extracts adsorbed onto aluminum hydroxide. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;151:17–27.

142. López-Matas MA, Gallego M, Iraola V, Robinson D, Carnés J: Depigmented allergoids reveal new epitopes with capacity to induce IgG blocking antibodies. *Biomed Res Int* 2013; 2013:284615.

143. Peng ZK, Nacleiro RM, Norman PS, Adkinson NF Jr: Quantitative IgE and IgG subclass responses during and alter long-term ragweed immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:519–529.

144. Lou W, Wang C, Wang Y, Han D, Zhang L: Enhancement of the frequency and function of IL-10-secreting type I T regulatory cells after 1 year of cluster allergen-specific immuno- therapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;159: 391–398.

145. Douladiris N, Savvatanos S, Roumpedaki I, Skevaki C, Mitsias D, Papadopoulos NG: A molecular diagnostic algorithm to guide pollen immunotherapy in Southern Europe: towards component-resolved management of allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;162:163–172.

146. Esch RE. Grass pollen allergens. *Clinical allergy and immunology*. 2008;21:107-26

147. Gleich GJ, Zimmermann EM et al. Effect of immunotherapy on immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six year prospective study. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 70:261-71.

148. Bachert C, Van Kempen M et al. Regulation of proinflammatory cytokines in seasonal allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;118: 375-379.

149. Hamid QA, Schotman E et al. Increases in IL-12 messenger RNA + cells accompany inhibition of allergen-induced late skin responses after successfully grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:254.

---

150. Bellinghausen I, Knop J et al. The role of Interleukin 10 in the regulation of allergic immune responses. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 97-101.

---

## **VIII. ANEXOS**

# Allergenic Profile to *Phleum pratense* and Immunological Changes Induced after Grass Allergen-Specific Immunotherapy

Juan M. Beitia<sup>a</sup> M. Angeles López-Matas<sup>b</sup> Ana Alonso<sup>a</sup> Aranzazu Vega<sup>a</sup>  
Belén Mateo<sup>a</sup> Remedios Cárdenas<sup>a</sup> Jerónimo Carnés<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Allergy Service, Hospital de Guadalajara, Guadalajara, and <sup>b</sup>R&D Department, Laboratorios LETI, S.L., Madrid, Spain

## Key Words

Component-resolved diagnosis · Specific immunotherapy · IgE · IgG4 · Cross-reactive carbohydrate determinants

## Abstract

**Background:** The introduction of molecular diagnoses has provided evidence of the existence of several different allergenic profiles in grass-sensitised individuals, reflecting the large number of allergens involved. This methodology has become a potent tool for a correct diagnosis and for the selection of the most appropriate immunotherapy. Based on these concepts, the objectives of this study were to determine the sensitisation profile of a grass-allergic population, and to treat them with specific immunotherapy. **Methods:** Patients suffering from rhinitis and/or asthma associated with grass pollen were recruited. The active group was treated with depigmented-polymerised allergenic extract of mixed grass pollen. sIgE and sIgG4 to *Phleum pratense*, and to its individual components (Phl p 1, 2, 4, 5b, 6, 7, 11 and 12) were determined at the beginning and end of the study. **Results:** The inclusion criteria were fulfilled by 139 individuals (36 in the control group and 103 in the active group). Phl p 1 (96.4%) and Phl p 4 (91.2%) were the most recognised aller-

gens, and 15.3% of individuals had positive IgE to cross-reactive carbohydrate determinants. Levels of antigen-specific IgG4 increased significantly after treatment, and the IgE/IgG4 ratio decreased significantly in all allergens after receiving allergen-specific immunotherapy. Non-significant differences were observed in the control group. **Conclusions:** A high percentage of sensitisation to Phl p 4 was observed. Immunological efficacy was studied by measuring sIgG4 levels and the IgE/IgG4 ratio before and after treatment. Sensitisation profiles should be taken into consideration to prepare the most appropriate immunotherapy containing all the relevant and needed allergens. © 2014 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Gramineae pollens are the main cause of IgE-mediated respiratory allergy worldwide [1]. The Gramineae family includes more than 650 botanical genera, spread around the world, though most of those which trigger pollinosis belong to the Pooideae subfamily. On the Iberian Peninsula, *Phleum*, *Poa*, *Dactylis*, *Lolium* and *Festuca* genera are the most representative [2].