

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

Alergia al polen de olivo: potencial terapéutico de péptidos definidos a partir de su alérgeno principal, Ole e 1

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

David Calzada Ricote

Directora

Blanca Cárdaba Olombrada

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**Alergia al polen de olivo: potencial terapéutico de Péptidos
definidos a partir de su alérgeno principal, Ole e 1**

Memoria para optar al Título de Doctor presentada por

DAVID CALZADA RICOTE

Bajo la dirección de

DRA. BLANCA CÁRDABA OLOMBRADA

Madrid, 2015

Portada: Esquema de la molécula alergénica Ole e 1. Se señalan en color verde y morado las regiones peptídicas estudiadas en esta Tesis Doctoral. Figura adaptada de Villalba M. *et al.*, 2014.

El trabajo presentado en esta memoria se ha realizado en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD) de Madrid, bajo la dirección de la Dra. Blanca Cárdbaba y financiado por una beca de Investigación Conchita Rábago y los Proyectos de Investigación FIS PI 10/0025 y PI 13/1730.

BLANCA CÁRDABA OLOMBRADA, DOCTOR EN BIOLOGÍA POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID E INVESTIGADOR DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (IIS-FJD).

CERTIFICA: Que Don **David Calzada Ricote** ha realizado bajo mi dirección y supervisión el trabajo necesario para la realización de su Tesis Doctoral: **Alergia al polen de olivo: potencial terapéutico de Péptidos definidos a partir de su alérgeno principal, Ole e 1.**

Revisado el trabajo, quedo conforme para su presentación y defensa como Tesis Doctoral, en la Facultad de Biología, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo la presente en Madrid a 17 de Marzo del dos mil quince.



Blanca Cárdena Olombrada

“La gota abre la piedra,
no por su fuerza sino por su constancia”

Ovidio

A mis padres

A mis hermanos

AGRADECIMIENTOS

Durante los cuatro años que he estado trabajando en esta Tesis, han sido muchas las personas que me han apoyado en el día a día, facilitándome el trabajo y motivándome para seguir adelante. Sin ellas no lo habría podido conseguir y por ello, estoy y estaré profundamente agradecido.

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Dra Blanca Cárdbaba, a Blanca, por acogerme en su laboratorio y en pensar en mí para realizar esta Tesis Doctoral. Gracias por el apoyo, la confianza, paciencia y dedicación que siempre me has mostrado. Es un gusto trabajar contigo, al igual que con el resto de compañeros de laboratorio. Gracias Miriam por todo lo que me has enseñado y por el tiempo que me has dedicado, a Selene, a quien ya conocía con anterioridad, gracias por tu amistad y tu disposición al trabajo en equipo, a José Manuel y a Sole con los que compartí mis inicios en la investigación y a Alba por echarme una mano con los últimos experimentos. No me quiero olvidar del Dr. Carlos Lahoz que nos ha ayudado siempre que le hemos necesitado, gracias por tu colaboración.

Este trabajo no se podría haber realizado sin los sujetos que voluntariamente han participado en el estudio y los doctores que los han reclutado y clasificado: Fernando Florido, Joaquín Quiralte, Julio Delgado y Alfonso Miranda. Gracias también al Dr. Jesús García Cantalejo, a Pedro Botías, y a los Doctores Manuel Mata, David Montaner y Joaquín Dopazo que nos han ayudado con los estudios de genómica.

Gracias a la Fundación Conchita Rábago por concederme una beca de Investigación de tres años de duración, especialmente a Marta Jiménez.

Quisiera destacar a todas las personas que han trabajado en el laboratorio 1 de Inmunología, brillantes científicos y mejores personas. Gracias Bea por tu implicación, a Cris y M^a Paz por su positividad, optimismo y ayuda desinteresada. A Vero y Ana, dos trabajadoras incansables; a Carla por transmitir tanta tranquilidad y sosiego; y como no, a los dos últimos grandes fichajes. Gracias Toño y Andrés, ha sido un placer coincidir con vosotros. Nos debemos un cordero en Sacramenia. Gracias también a los residentes, por resolverme las dudas de ámbito clínico y a la Dra. Victoria del Pozo por sus ánimos.

Asimismo, quisiera agradecer a los miembros del laboratorio 4: Dr. Fernando Vivanco y a todo su equipo, Gloria, Carlos, Marta, Laura y Aroa la ayuda y los ánimos recibidos.

Gracias a la Dra. Rosa Delgado, por su cercanía, afectividad y por organizar los seminarios semanales con los que tanto he aprendido. Gracias a todos los que han participado en ellos y al

servicio de Inmunología Clínica. En especial, a los que me acompañaron en el Congreso de Salamanca del 2013.

Querría reconocer y agradecer el trabajo del resto de los grupos de investigación de la Fundación Jiménez Díaz: Nefrología, Metabolismo mineral y óseo y un largo etcétera. En especial a los becarios con los que he mantenido tantas conversaciones científicas y no tan científicas.

Quiero agradecer la labor de las auxiliares de laboratorio Flor, Isabel y a ti Pilar, por el interés y el cariño que me has mostrado. Gracias también a Carmen por los ratos compartidos.

Gracias a Ignacio Mahillo, por sus explicaciones y ayuda con la estadística; a Oliver por las correcciones sugeridas en los artículos; a Valentín por su rapidez a la hora de conseguir *papers* inaccesibles y a Curra, por su paciencia y los buenos momentos en el microscopio confocal. Al departamento de compras, por su atención, en especial a Eva, a María y a Ana.

Quiero agradecer a mis amigos y familiares por ser dos de los pilares fundamentales sobre los que se ha sustentado todo esto:

A mis amigos, sin entrar en nombres. Cada uno de vosotros me aporta algo que me enriquece, me motiva y me ayuda. Gracias por los años que he compartido con vosotros, y por los que aún nos quedan.

A mi madre por darme todo. Por enseñarme el sentido de la responsabilidad, por tu fuerza de voluntad, por tu entereza, y porque junto a papá me habéis transmitido que aunque no sea fácil, uno puede conseguir lo que se proponga. A mis hermanos, Alfonso y Alberto dos de las personas que más me han enseñado. Gracias por todas las vivencias que hemos compartido durante estos 27 años. A mis cuñadas, Soraya y Silvia por su ayuda incondicional, y a los nuevos miembros de la familia: mis sobrinos, que con unos pocos meses, Pablo y Leo me han amenizado muchos de los interminables días de redacción. De un modo muy general, que sois un grupo numeroso, quiero agradecer a mis tíos, primos y abuela todo vuestro cariño y apoyo.

Por último me gustaría agradecer a los que no han podido ver finalizado mi trabajo. Gracias por todos los valores que me habéis inculcado. Esta Tesis lleva vuestro sello y espero haberlo transmitido. Gracias abuelos, primos y sobre todo a ti, papá, por alegrarte como el que más.

ÍNDICE

ÍNDICE	17
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	27
SUMMARY	35
ABREVIATURAS, SIGLAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS	43
INTRODUCCIÓN	49
1 TIPOS DE RESPUESTA INMUNE FRENTE A UNA SUSTANCIA INOCUA	51
1.1 RESPUESTA TOLEROGÉNICA.....	51
1.1.1 Células reguladoras	51
1.1.1.1 Células T reguladoras.....	52
1.1.1.2 Células B reguladoras.....	54
1.1.2 Citocinas reguladoras	54
1.1.2.1 Interleucina 10 (IL-10)	54
1.1.2.2 Factor de crecimiento transformante β (TGF- β)	55
1.2 RESPUESTA ALÉRGICA.....	57
1.2.1 Alérgenos.....	60
1.2.1.1 Epítomos antigénicos	61
1.2.1.1.1 Epítomos B	61
1.2.1.1.2 Epítomos T	62
1.2.2 Tratamiento etiológico en las enfermedades alérgicas	62
1.2.2.1 Inmunoterapia con extractos alérgicos.....	63
1.2.2.1.1 Mecanismos de acción.....	65
1.2.2.1.2 Eficacia.....	67
1.2.2.2 Nuevas aproximaciones	68
1.2.2.2.1 Inmunoterapia con extractos y <i>Omalizumab</i>	68
1.2.2.2.2 Inmunoterapia basada en el DNA	69
1.2.2.2.3 Inmunoterapia con alérgenos recombinantes.....	70
1.2.2.2.4 Inmunoterapia con hipoalérgenos	71

1.2.2.2.5 Inmunoterapia basada en péptidos	71
2 ALERGIA AL POLEN DE OLIVO.....	73
2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Olea europaea</i>	73
2.2 CARACTERÍSTICAS DE LA POLINOSIS AL OLIVO	74
2.3 ALÉRGENOS.....	75
2.3.1 Ole e 1	77
2.3.1.1 Epítomos B	78
2.3.1.2 Epítomos T.....	79
2.4 MECANISMOS INMUNOLÓGICOS IMPLICADOS	79
2.5 TRATAMIENTO ETIOLÓGICO	80
2.5.1 Nuevas aproximaciones	83
2.5.1.1 Inmunoterapia con hipolárgenos	83
2.5.1.2 Inmunoterapia basada en péptidos.....	83
3 NUEVAS HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS	84
3.1 USO DE MICROARRAYS EN ALERGIA	84
OBJETIVOS.....	87
MATERIALES Y MÉTODOS.....	91
1 POBLACIÓN DE ESTUDIO	93
1.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	93
1.2 CLASIFICACIÓN DE LOS SUJETOS	93
1.3 NOMENCLATURA DE LOS SUJETOS	95
1.4 RECOGIDA DE MUESTRAS.....	96
2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA	96
2.1 OBTENCIÓN DE SUERO	96
2.2 AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC).....	96

3 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE IgE TOTAL Y ANTICUERPOS IgE ESPECÍFICOS FRENTE AL EXTRACTO COMPLETO DE POLEN DE <i>Olea europaea</i> EN SUERO	98
4 ENSAYOS DE ESTIMULACIÓN DE LAS PBMC	98
4.1 ESTÍMULOS UTILIZADOS	98
4.1.1 Purificación del extracto de polen de <i>Olea europaea</i>	98
4.1.2 Síntesis de los Péptidos	99
4.2 DESCONGELACIÓN DE LAS PBMC	100
4.3 ENSAYOS CELULARES	101
5 MEDIDA DE LOS NIVELES DE CITOCINAS SOLUBLES EN EL SOBRENADANTE DE CULTIVO 102	102
5.1 ESTUDIO DE CITOCINAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	102
5.2 ESTUDIO DE TGF- β 1 MEDIANTE ELISA	104
6 EXTRACCIÓN DEL RNA	105
6.1 MEDIDA DE LA INTEGRIDAD DEL RNA.....	105
6.2 CUANTIFICACIÓN DEL RNA	107
7 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MASIVA MEDIANTE <i>MICROARRAYS</i>	108
7.1 SELECCIÓN DE SUJETOS DE ESTUDIO	108
7.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE RNA	108
7.3 <i>MICROARRAYS</i> DE EXPRESIÓN GÉNICA DE AFFYMETRIX	110
7.3.1 Protocolo de transcripción	112
7.3.1.1 Preparación de las muestras y controles.....	112
7.3.1.2 Síntesis de la doble cadena de cDNA del primer ciclo	112
7.3.1.2.1 Síntesis de la primera cadena de cDNA del primer ciclo.	112
7.3.1.2.2 Síntesis de la segunda cadena de cDNA del primer ciclo.....	113
7.3.1.3 Síntesis y purificación del cRNA.....	113
7.3.1.4 Síntesis de la doble cadena de cDNA del segundo ciclo.....	114
7.3.1.4.1 Síntesis de la primera cadena de cDNA del segundo ciclo	114
7.3.1.4.2 Síntesis de la segunda cadena de cDNA del segundo ciclo	115
7.3.1.4.3 Limpieza del cDNA de doble cadena	116

7.3.1.5 Síntesis y limpieza del cRNA marcado con biotina.....	116
7.3.2 Hibridación.....	117
7.3.3 Escaneado del <i>microarray</i>	119
7.3.4 Corrección y normalización de los datos.....	119
7.3.5 Análisis de Componentes Principales (PCA).....	119
7.3.6 Análisis estadístico de las diferencias de expresión génica.....	120
7.3.7 Análisis funcional de los datos de expresión génica.....	120
8 VALIDACIÓN DE GENES MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR).....	121
8.1 SELECCIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO.....	121
8.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	121
8.3 SELECCIÓN DE GENES A VALIDAR.....	122
8.4 ANÁLISIS DE MUESTRAS POR qRT-PCR EN TARJETAS MICROFLUÍDICAS.....	123
8.5 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN GÉNICA OBTENIDOS POR qRT-PCR.....	124
8.5.1 Normalización, filtrado de los resultados y análisis estadístico.....	124
8.6 ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	125
9 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN-BLOT.....	126
9.1 EXTRACCIÓN PROTEICA.....	126
9.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	127
9.3 ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS.....	127
9.4 INMUNODETECCIÓN.....	128
10 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN E INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE PBMC.....	129
11 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	131
RESULTADOS.....	133
1 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	135

1.1	Características demográficas.....	135
1.2	Características clínicas.....	136
2 NIVELES DE IgE TOTAL Y ANTICUERPOS IgE ESPECÍFICOS FRENTE AL EXTRACTO COMPLETO DE POLEN DE <i>Olea europaea</i> EN SUERO		136
3 NIVELES DE CITOCINAS SOLUBLES EN SOBRENADANTES DE PBMC ESTIMULADAS.....		138
3.1	ANÁLISIS GLOBAL DE SECRECIÓN DE CITOCINAS EN LOS CINCO GRUPOS CLÍNICOS.....	139
3.1.1	Comparaciones entre los grupos clínicos, en muestras sin estimular, en el mismo periodo de exposición al alérgeno.....	139
3.1.2	Comparaciones entre las distintas condiciones experimentales y periodos de exposición al alérgeno en cada uno de los grupos clínicos (comparaciones intragrupo).	141
3.2	ANÁLISIS DE SECRECIÓN DE CITOCINAS ENTRE LOS GRUPOS DE SUJETOS NO ALÉRGICOS Y LOS SUJETOS ALÉRGICOS AL POLEN DE OLIVO SIN TRATAMIENTO.....	150
3.2.1	Niveles de IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-13 y TNF- α	150
3.2.2	Niveles de citocinas reguladoras	152
3.2.2.1	Niveles de IL-10.....	152
3.2.2.2	Niveles de TGF- β	152
3.3	ANÁLISIS DE SECRECIÓN DE CITOCINAS EN EL GRUPO DE SUJETOS ALÉRGICOS AL POLEN DE OLIVO SIN TRATAMIENTO.....	154
3.3.1	Comparaciones entre las distintas condiciones experimentales para un mismo periodo de exposición al alérgeno.	154
3.3.1.1	Niveles de IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-13 y TNF- α	154
3.3.1.2	Niveles de citocinas reguladoras.....	155
3.3.1.2.1	Niveles de IL-10	155
3.3.1.2.2	Niveles de TGF- β	155
3.3.2	Comparaciones entre los dos periodos de exposición al antígeno para cada una de las condiciones experimentales	156
3.3.2.1	Niveles de IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 y TNF- α	156
3.3.2.2	Niveles de citocinas reguladoras.....	156
3.3.2.2.1	Niveles de IL-10	156
3.3.2.2.2	Niveles de TGF- β	156

4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MASIVA MEDIANTE <i>MICROARRAYS</i>	158
4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO	158
4.2 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA GLOBAL.....	159
4.2.1 Análisis preliminar de la expresión génica diferencial entre los distintos grupos clínicos respecto al grupo de sujetos no alérgicos	163
4.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL ENTRE LOS GRUPOS DE SUJETOS NO ALÉRGICOS Y LOS SUJETOS ALÉRGICOS AL POLEN DE OLIVO SIN TRATAMIENTO.....	165
4.3.1 Expresión génica diferencial.....	165
4.3.2 Estudio funcional de los genes.....	166
4.3.2.1 Vías funcionales definidas por KEGG.....	167
4.3.2.2 Procesos biológicos definidos por GO	173
4.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN EL GRUPO DE SUJETOS ALÉRGICOS AL POLEN DE OLIVO SIN TRATAMIENTO.....	174
4.4.1 Expresión génica diferencial.....	174
4.4.2 Estudio funcional de los genes.....	175
4.4.2.1 Vías funcionales definidas por KEGG.....	175
4.4.2.2 Procesos biológicos definidos por GO	178
5 VALIDACIÓN DE GENES MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR)	179
5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO	179
5.2 SELECCIÓN DE LOS GENES A VALIDAR	179
5.3 ANÁLISIS A NIVEL GLOBAL.....	184
5.4 ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	185
5.5 ESTUDIO FUNCIONAL DE GENES	191
6 NIVELES DE EXPRESIÓN PROTEICA	192
7 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN E INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE PBMC	195
7.1 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN.....	195

7.2 ENSAYOS DE INHIBICIÓN	196
DISCUSIÓN.....	199
1 CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	202
2 MODULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE CITOCINAS DEBIDA A LOS ESTÍMULOS.....	204
3 MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA INDUCIDA POR LOS ESTÍMULOS.....	208
3.1 A NIVEL GLOBAL	208
3.2 EN LOS SUJETOS ALÉRGICOS AL POLEN DE OLIVO SIN TRATAMIENTO Y LOS NO ALÉRGICOS	209
3.3 EN LOS SUJETOS ALÉRGICOS AL POLEN DE OLIVO SIN TRATAMIENTO	216
4 POTENCIALES DIANAS TERAPÉUTICAS DEFINIDAS POR EL PÉPTIDO 2+3	218
5 EL PÉPTIDO 2+3 INHIBE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA INDUCIDA POR OLEA	226
CONCLUSIONES.....	231
BIBLIOGRAFÍA.....	235
ANEXO.....	267

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Poblaciones de células Treg.....	52
Figura 2. Principales funciones de las células Treg.....	53
Figura 3. Sensibilización al alérgeno y desarrollo de células B específicas.....	58
Figura 4. Fase efectora de la respuesta alérgica.....	60
Figura 5. Posibles efectos de la inmunoterapia específica con alérgenos (AIT).....	67
Figura 6. Futuro de la inmunoterapia en la alergia.....	68
Figura 7. Secuencia de Ole e 1.....	77
Figura 8. Fraccionamiento de sangre completa por gradiente de densidad.....	97
Figura 9. Secuencias de los péptidos derivados de Ole e 1.....	100
Figura 10. Principio de la técnica utilizada en la cuantificación de citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ	103
Figura 11. RNA Nano-chip.....	107
Figura 12. Protocolo de <i>HuGe U 133 plus 2.0 GeneChip</i> de Affymetrix.....	111
Figura 13. Niveles medios de IgE total.....	137
Figura 14. Niveles medios de anticuerpos IgE específicos frente al extracto completo de polen de <i>Olea europaea</i>	138
Figura 15. Niveles de secreción de IL-10.....	153
Figura 16. Niveles de secreción de TGF- β	153
Figura 17. Niveles de secreción de IL-10 en los sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.....	157
Figura 18. Niveles de secreción de TGF- β en los sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.....	157

Figura 19. Análisis por ANOVA de fuentes de variación en el estudio.....	159
Figura 20. Análisis de fuentes de variación, eliminando la fecha de escaneado.....	160
Figura 21. Número de sondas génicas diferenciales debido a la condición clínica de los sujetos de estudio y debido a los estímulos recibidos.....	160
Figura 22. Análisis por PCA de las muestras sin estimular.....	161
Figura 23. Análisis por PCA de todas las muestras incluidas en el estudio.....	161
Figura 24. Análisis por PCA de las muestras separadas por cada grupo clínico.....	162
Figura 25. Vías funcionales diferenciales, definidas por KEGG, entre pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento y el grupo de sujetos no alérgicos en cada condición experimental, durante el periodo de polinización.....	169
Figura 26. Vías funcionales diferenciales, definidas por KEGG, entre alérgicos al polen de olivo sin tratamiento y el grupo de sujetos no alérgicos, en cada condición experimental, fuera del periodo de polinización.....	171
Figura 27. Vía "Asma".....	172
Figura 28. Vía de "Interacción de ligandos-receptores neuroactivos".....	172
Figura 29. PCA obtenido para el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.....	174
Figura 30. Vía Interacción receptores citocina-citocina.....	177
Figura 31. <i>Heat map</i> de los 189 genes.....	185
Figura 32. <i>Heat maps</i> de los 51 genes diferencialmente expresados.....	190
Figura 33. Red de interacción proteica.....	192
Figura 34. Ejemplo representativo de inmunodetección de proteínas mediante <i>Western-Blot</i>	193
Figura 35. Niveles medios de expresión de EBI3, FPR3 y TREM1 relativizados frente a β -ACTINA..	194
Figura 36. Índices de estimulación medios.....	196

Figura 37. Porcentaje de proliferación celular obtenidos en los experimentos de inhibición de la respuesta frente a Olea (100% de proliferación)	197
--	-----

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Funciones de IL-10 y TGF- β en las células diana.	56
Tabla 2. Alérgenos del polen de olivo. Principales características e implicación clínica.....	76
Tabla 3. Secuencias de los Péptidos utilizados.....	99
Tabla 4. Caracterización de los <i>pools</i> utilizados en los análisis de expresión génica por microarrays.	109
Tabla 5. Número total de muestras de RNA utilizadas en los microarrays.	109
Tabla 6. Mezcla del <i>buffer</i> Poli-A/oligo (dT)-T7.	112
Tabla 7. Mezcla de reacción del RNA/ <i>Buffer</i> Poli-A/oligo (dT)-T7.	112
Tabla 8. Mezcla de reacción para la síntesis de la primera cadena de cDNA del primer ciclo.....	113
Tabla 9. Mezcla de reacción para la síntesis de la segunda cadena de cDNA del primer ciclo.	113
Tabla 10. Mezcla de reacción <i>In Vitro Transcription Technology</i>	114
Tabla 11. Mezcla de reacción para la síntesis de la primera cadena de cDNA del segundo ciclo.....	115
Tabla 12. Mezcla de reacción para la síntesis de la segunda cadena de cDNA del segundo ciclo. ..	115
Tabla 13. Mezcla de reacción para la síntesis de cRNA marcado con biotina.....	116
Tabla 14. Mezcla de reacción de hibridación.....	117
Tabla 15. Solución de marcaje (SAPE).	118
Tabla 16. Solución de anticuerpos.....	118
Tabla 17. Configuración de los <i>pools</i> utilizados en la validación de datos.	122
Tabla 18. Características de los anticuerpos utilizados.	129

Tabla 19. Características demográficas y clínicas de los sujetos de estudio.....	135
Tabla 20. Niveles medios de citocinas por grupos de estudio y periodo analizado. Valores expresados en pg/ml. A) IL-2. B) Niveles medios de la citocina Th1: IFN- γ . C) Niveles medios de citocinas Th2: C.1. IL-4, C.2. IL-5, C.3. IL-13. D) TNF- α . E) Niveles medios de citocinas Treg : E.1. IL-10, E.2. TGF- β	142
Tabla 21. Niveles medios de citocinas IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α	151
Tabla 22. Niveles medios de citocinas IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α en el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.....	157
Tabla 23. Características demográficas y clínicas de los sujetos seleccionados para el análisis de microarrays.....	158
Tabla 24. Número de sondas génicas diferencialmente expresadas.....	163
Tabla 25. Número de genes sobreexpresados y reprimidos en los sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento respecto a los sujetos no alérgicos en cada condición experimental.....	165
Tabla 26. Número de vías funcionales, definidas por KEGG, sobreexpresadas y reprimidas, en el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento respecto a los sujetos no alérgicos, en cada condición experimental.....	167
Tabla 27. Número de procesos biológicos GO redundantes, sobreexpresados y reprimidos en el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento respecto al grupo de sujetos no alérgicos obtenidos, para cada condición experimental.....	173
Tabla 28. Número de procesos biológicos GO no redundantes, sobreexpresados y reprimidos, en el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento respecto al grupo de sujetos no alérgicos obtenidos, para cada condición experimental.....	173
Tabla 29. Número de sondas génicas diferencialmente expresadas en el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.....	174
Tabla 30. Número de vías funcionales, definidas por KEGG, diferencialmente expresadas en el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.....	175

Tabla 31. Vías funcionales, definidas por KEGG, diferencialmente expresadas en el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.....	176
Tabla 32. Número de procesos biológicos GO redundantes, diferencialmente expresados en el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.....	178
Tabla 33. Número de procesos biológicos GO no redundantes, diferencialmente expresados en el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.....	178
Tabla 34. Características demográficas y clínicas de los sujetos alérgicos al polen de olivo, sin tratamiento, seleccionados para la validación de genes.....	179
Tabla 35. Genes seleccionados para validación por qRT-PCR.....	180
Tabla 36. Número de genes diferenciales estadísticamente significativos en cada comparación.	186
Tabla 37. Comparación Péptido 2+3 vs Basal.....	187
Tabla 38. Comparación Péptido 2+3 vs Olea.....	188
Tabla 39. Comparación Péptido 10+12+13 vs Péptido 2+3.....	189
Tabla 40. Clasificación funcional de genes mediante el programa DAVID.....	191
Tabla 41. Resumen de los hallazgos más relevantes discutidos en este trabajo. Evidencias del potencial terapéutico de los Péptidos utilizados.....	229

SUMMARY

OLIVE POLLEN ALLERGY: THERAPEUTIC POTENTIAL OF PEPTIDES, DEFINED FROM THE MAIN ALLERGEN, OLE E 1

BACKGROUND

The immune system is regulated to protect the host from exaggerated stimulatory signals establishing a state of tolerance in healthy individuals, characterized by functional inactivation due to specific T-cell subtypes with an immunosuppressive function, generically named regulatory T cells (Tregs). The disequilibrium in immune regulatory vs effector mechanisms results in allergic or autoimmune disorders (depending on the nature of the antigen) in genetically predisposed subjects under certain environmental conditions. In allergic diseases, sensitization to a specific antigen is a prerequisite for the onset of atopic diseases and to prime the Th2 cell response in which interleukin (IL)-4 and IL-13 drive immunoglobulin E (IgE) class-switch in B cells, and the recruitment and activation of proinflammatory cells (e.g. eosinophils and mast cells) in mucosal target organs.

Allergen-specific immunotherapy (AIT) is the only treatment able to change the course of the diseases. Although applied for 100 years to cure allergy, this approach is not fully optimal: AIT can cause anaphylactic reactions as well as new IgE sensitization to other allergens present in the extract. Furthermore, the lengthy duration (3 to 5 years), the frequent administration, and the high cost of treatment are other disadvantages. For these reasons, there is a need for safe and more effective AIT strategies. Novel approaches include recombinant allergens, hypoallergenic allergen derivatives, and T cell peptides.

Olive (*Olea europaea*) pollen is one of the most important causes of respiratory allergy in the Mediterranean area. Olive pollen induces mainly nasal and conjunctival symptoms, although it may also induce exacerbation of asthma in areas with high antigenic load, such as Andalusia (a region in southern Spain with particularly high pollen counts during the pollen season, 5,000 grains/m³ with peaks reaching more than 10,000 grains/m³). The incidence is high during the olive pollination season (from mid-April to the end of June).

To date, twelve olive-pollen allergens have been identified. The major allergen, Ole e 1, recognized by around 80% of allergic subjects, is a single polypeptide chain of 145 amino acids that shows a high degree of sequence homology and IgE cross-reactivity with the main allergens in other Oleaceae-family pollens such as lilac, privet, and, in particular, to ash.

Ole e 1 has at least 4 B-cell epitopes and 2 regions, amino-acids (aa)91 to 102 and aa119 to 130 that are defined as immunodominant T-cell epitopes. Several works have analyzed the IgG and IgE B-cell epitopes of Ole e 1 for developing a molecule-based therapeutic strategy.

In addition, a pilot study showed how stimulation with Ole e 1 peptides induced a different cytokine profile in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from olive pollen-allergic patients compared to non-allergic subjects, according to IL-10, being the peptides that included aa11-33 Ole e 1 region, mainly recognized by non-allergic subjects, and postulated as possible immunoregulatory peptides.

OBJECTIVE

To analyze the specific response to the whole olive pollen extract and, to determine, *in vitro*, the immunoregulatory capacity of Ole e 1-derived peptides in a well-characterized population. The proposal is to research the immunological mechanisms implicated in allergy response to olive pollen and to define new therapeutic targets.

MATERIALS AND METHODS

The study population comprised 84 subjects clinically classified into 5 groups: Group 1, non-allergic; Group 2, asymptomatic, sensitized to olive pollen; Group 3, allergic to allergens other than olive pollen; Group 4, allergic to olive pollen (without treatment); and Group 5, allergic to olive pollen treated with AIT. The subjects were diagnosed and recruited at the Allergy Service of hospitals in Andalusia based on clinical symptoms and the results of the skin prick test for olive-pollen extract and a battery of common allergens. Sera and PBMCs were obtained during and outside the pollinization season.

To characterize the humoral response, serum levels of total IgE and olive pollen-specific IgE antibodies were analyzed.

PBMCs (10^6 cells) from each subject were cultured for 24 hours at 37°C, 5% CO₂ in humidified air, in RPMI 1640 supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) inactivated, 1% L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin, and 1mM sodium pyruvate in the absence or presence of olive pollen stimuli: olive pollen extract (named Olea, 25 µg/ml), and the peptides derived from Ole e 1 named Peptide 2+3 (5 µg/ml), aa11-33, (pointed out as theoretically immunoregulatory epitopes), and Peptide 10+12+13 (5 µg/ml), aa91 to 102 and aa119 to 130 previously defined as immunodominant T-cell epitopes).

Phytohemagglutinin (PHA) (2.5 µg/ml) was used as positive control. Concentration and combination of stimuli were based on previous assays.

After stimulation, the supernatants were used to measure soluble cytokine levels: IL-2, TNF- α , IFN- γ (Th1 cytokine), IL-4, IL-5 and IL-13 (Th2 cytokines), IL-10 and TGF- β (Treg cytokines); flow cytometry and ELISA were used for these determinations.

Total RNA of the PBMCs was extracted. The whole gene expression of a total of 120 RNA samples (6 patients x 5 groups x 2 exposure moments x 4 experimental conditions) was studied using the Affymetrix HGU133 plus 2.0 microarray. Functional studies were carried out using two data bases: GO (Gene Ontology) for Biological Process and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) for pathways.

The results of one hundred and eighty-nine transcripts of the most representative and statistically significant genes among the experimental conditions were validated in a new population of olive pollen-allergic subjects, recruited outside the pollen season, by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Functional analyses of the most significant genes were performed using DAVID Bioinformatics results and the STRING 9.0 free program. The protein expression of three of the validated genes was analyzed by Western blot.

Furthermore, assays to determine the capacity to inhibit the proliferative response against Olea by the Ole e 1 peptides were performed in five non-allergic subjects and in eight olive-allergic patients, using the Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay.

RESULTS

The characterization of the population showed that asymptomatic subjects had the highest total IgE levels. Untreated and treated olive pollen-allergic patients showed the highest specific IgE antibody levels. At basal level, it was not possible to define a clear pattern of secreted cytokines between the five groups. However, in the gene expression analysis, the principal component assays (PCA) identified five different gene expression clusters correlating with the five clinical groups.

Regarding the behavior of the stimuli, the most interesting results were found when the untreated olive pollen-allergic patients were compared with the non-allergic group. The most differential cytokines were IL-10 and TGF- β mean levels. Interestingly, during the pollen season, samples from olive pollen-allergic patients stimulated with Peptide 2+3 showed the highest IL-10 levels. In contrast, this stimulus, in samples recruited outside pollen season, showed the lowest mean levels.

Unexpectedly, stimulation with *Olea* in this period induced a strong increase of IL-10. TGF- β mean levels were higher in non-allergic than in allergic samples, except for patient samples stimulated with the possible immunomodulatory Peptide (Peptide 2+3) collected outside pollen season. In this case, this Peptide induces a statistically significant increase of TGF- β levels. These results suggest that these regulatory mechanisms are involved in this allergy, and more important, pointing to how these mechanisms of regulation could be different according the environmental moment of pollen exposure.

According to gene expression, the PCA analysis did not show a clear pattern in the non-allergic group; however, allergic-subject samples grouped in clusters correlated with experimental conditions. These results indicate that the stimuli modulate different genes in these patients. Furthermore, KEGG analysis revealed that in samples recruited outside pollen season (likely the condition more representative of what could happen biologically), the comparison of basal samples between control and allergic groups showed a very high number of statistically increased pathways in allergic subjects, related and unrelated with immune response. But interestingly, the comparisons between groups of *Olea europaea* extract and stimulated samples with Ole e 1 T-cell Peptides showed that the stimuli, in concordance with cytokine results and global gene-expression analysis, seem to modulate some specific pathways. Indeed, Peptide 2+3 showed the lowest number of differential pathways compared with controls, and this was the only stimulus that did not induce the asthma pathway. In addition, comparisons of the 4 experimental conditions (basal and stimuli) in the group of allergic subjects revealed that there were fewer differential pathways and biological process deregulated comparing peptides stimulation and basal, than between *Olea europaea* extract stimulation and basal, and there were several differences among stimuli.

In the olive pollen-allergic patients, the validation of the 189 most significant differential transcripts confirmed that these genes were differentially expressed among the experimental conditions, but specifically, their gene expression defined the response of the 100% samples stimulated with Peptide 2+3. Subsequent analysis of the most differential genes according to this peptide stimulation provided a profile of 51 genes: ABHD2, ADAM28, APOE, CAMK1, C1QC, CCL20, CCL22, CD36, CD84, CD86, CXCL1, DAB2, DNMT1, EBI3, FAAH2, FCN1, FPR3, FUCA1, GAA, GDE1, GPNMB, IL1A, IL1B, IL2RA, IL6, IL24, INHBA, ITGB8, LGMN, LRP1, MPEG1, ME1, MIR155HG, MYOF, PIPI4K2A, PSAP, PTGS2, RNASE1, SEMA6B, SERPINB2, SPINK1, STAB1, ST14, TFPI2, TGF β I, TLR4, TREM1, TREM2, UBASH3B, WNT5A, and ZNF467. The functional analysis of these genes revealed that the main clustering was related with the immune response; most of them codify proteins implicated in the maintenance of peripheral T-tolerance and inflammatory response. It was not possible to define

these differences of expression by analyzing the protein levels of three genes (EBI3, FPR3 and TREM1) by Western blot.

Finally, in accordance with our previous results, the proliferation assays with and without peptides as inhibitors, showed that Peptide 2+3 was able to inhibit partially, the total Olea extract cellular response, as shown by a significant decrease in the stimulation index of PBMCs from untreated allergic subjects.

CONCLUSIONS

It has been demonstrated how, according to the stimuli used and the environmental moment of pollen exposure, different mechanisms of regulation could be implicated in olive-pollen response. Furthermore, Peptide 2+3 (aa11-33 of Ole e 1) could regulate the immune response in olive pollen-allergic patients because it modulates the levels of Treg cytokines, changes the gene-expression levels of regulation-related genes, and inhibits the total Olea extract cellular proliferative response. All of these results indicate that Peptide 2+3 could be useful as a new therapeutic tool for this allergy.

**ABREVIATURAS, SIGLAS,
ACRÓNIMOS Y
SÍMBOLOS**

- **18S** Subunidad de 18 unidades *Svedberg* del ribosoma
- **Δ** Incremento
- **aa** Aminoácido
- **Abs** Absorbancia
- **AIT** Inmunoterapia específica con alérgenos
- **AMPC** Adenosín monofosfato cíclico
- **ANOVA** Análisis de la Varianza
- **APC** Célula presentadora de antígeno
- **Asn** Asparagina
- **BCA** Ácido Bicinconínico
- **BRE** *Batch Removal Effect*
- **Breg** Célula B reguladora
- **BSA** Albúmina de suero bovino
- **CBA** *Cytometric Bead Array*
- **CD** Cúmulo de diferenciación (*Cluster of differentiation*). Marcador de superficie molecular
- **cDNA** Ácido desoxirribonucleico complementario
- **CIPF** Centro de Investigación Príncipe Felipe
- **CpG** Dinucleótidos de citosina-fosfato-guanina
- **cRNA** RNA codificado a partir de cDNA
- **Ct** *Threshold cycle*, ciclo umbral
- **CTLA-4** Antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico
- **DAVID** Base de datos de genes con herramientas de anotación (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*)
- **DEPC** Dietilpirocarbonato
- **DMSO** Dimetilsulfóxido

- **DNA** Ácido desoxirribonucleico
- **dNTP** Dexosirribonucleótidos trifosfato
- **EAACI** *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*
- **EDTA** Ácido etilendiaminotetraacético
- **ELISA** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
- **FcεRI** Receptor de alta afinidad para la IgE
- **FDR** *False Discovery Rate*
- **Fmoc** *Fmoc*-trinucleósido-difosfato fosforamiditos
- **FOXP3** Caja *forkhead* P3
- **g** Fuerza centrífuga relativa
- **GAPDH** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- **GEO** Base pública para datos experimentales de *microarrays* (*Gene Expression Omnibus*)
- **GM-CSF** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
- **GO** Base de datos *Gene Ontology*
- **HEPES** Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico
- **HLA** Antígeno leucocitario humano
- **ID** Identificador numérico de la sonda génica
- **I.E.** Índice de estimulación
- **IFN** Interferón
- **Ig** Inmunoglobulina
- **IIS-FJD** Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz
- **IL** Interleucina
- **ISS** Oligodeoxinucleótidos inmunoestimuladores
- **iTreg** Célula T reguladora inducida
- **IUIS** *Internacional Union of Immunology Societies*

- **IVT** *In Vitro Transcription Technology*
- **kDa** Kilodalton
- **KEGG** Base de datos *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
- **kUA** Kilo Unidades Arbitrarias
- **LOR** *Log Odds Ratio*
- **MHC** Complejo Principal de Histocompatibilidad
- **MM** *Missmatch*
- **mRNA** RNA mensajero
- **NCBI** *National Center for Biotechnology Information*
- **NK** Célula *Natural Killer*
- **nTreg** Célula T reguladora natural
- **OIT** Inmunoterapia oral
- **Olea** Extracto completo de polen de olivo (*Olea europaea*)
- **Ole e 1** Alérgeno principal de *Olea europaea*
- **OMS** Organización Mundial de la Salud
- **p** p-valor (estadístico)
- **P2+3** Péptido 2+3 (Péptido 2 + Péptido 3) derivados de Ole e 1
- **P10+12+13** Péptido 10+12+13 (Péptido 10 + Péptido 12 + Péptido 13) derivados de Ole e 1
- **PBMC** Células mononucleares de sangre periférica
- **PCA** Análisis de Componentes Principales
- **PCR** Reacción en cadena de la polimerasa
- **PD-1** Proteína 1 de muerte celular programada
- **PE** Ficoeritrina
- **PHA** Fitohemaglutinina
- **PM** *Perfect match*

48 | ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

- **qRT-PCR** PCR cuantitativa en tiempo real
- **RNA** Ácido ribonucleico
- **RPMI** Medio *Roswell Park Memorial Institute*
- **SCIT** Vacunas subcutáneas
- **SDS** Dodecilsulfato sódico
- **SEAIC** Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica
- **S.I.** Sistema Inmunitario
- **SLIT** Vacunas sublinguales
- **SS** Suero salino isotónico al 0.9%
- **STRING** *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*
- **TCR** Receptor de células T
- **TGF** Factor de crecimiento transformante
- **Th** Célula T *helper*
- **TNF** Factor de necrosis tumoral
- **Treg** Célula T reguladora
- **UA** Unidades arbitrarias
- **UI** Unidades internacionales
- **VLP** Partículas parecidas a virus

INTRODUCCIÓN

La presente Tesis Doctoral se centra en el estudio, *in vitro*, de la respuesta tolerogénica y alérgica al polen de olivo y el posible restablecimiento de la tolerancia, mediante Péptidos que derivan del alérgeno principal, Ole e 1, con el fin de identificar nuevas herramientas terapéuticas.

1 TIPOS DE RESPUESTA INMUNE FRENTE A UNA SUSTANCIA INOCUA

El Sistema Inmunitario (S.I.) tiene como función proteger al organismo de patógenos y tolerar antígenos propios y extraños que no producen patogenicidad en el individuo. Sin embargo, la alteración de la tolerancia o, lo que es lo mismo, la desregulación del funcionamiento del S.I., implica el desarrollo de enfermedades de origen autoinmune o alérgicas (en función de la naturaleza del antígeno) (Soyer O.U. *et al.*, 2013; Kucuksezer U.C. *et al.*, 2013). En concreto, la respuesta del S.I. ante un antígeno ambiental inocuo puede clasificarse en tolerogénica (ausencia de respuesta) o alérgica (reacción de hipersensibilidad o exagerada): respuesta derivada hacia el fenotipo T *helper* de tipo 2 (Th2) y la producción de inmunoglobulinas de tipo E (IgE).

1.1 RESPUESTA TOLEROGÉNICA

La tolerancia inmunológica se define como la ausencia específica de respuesta ante el antígeno (tolerógeno) y está controlada por diferentes mecanismos de supresión activa dotados de especificidad y memoria.

La respuesta tolerogénica frente a antígenos extraños se desarrolla a nivel periférico. Los principales mecanismos que la controlan son la eliminación clonal y la anergia clonal, aunque también es posible perder la capacidad de respuesta frente a un antígeno determinado, a pesar de la presencia de linfocitos maduros que responden a él. En esta situación, el crecimiento y diferenciación de los linfocitos inmunocompetentes pueden ser inhibidos activamente mediante distintos mecanismos, entre los que destacan los relacionados con las células y citocinas reguladoras (Sakaguchi S. *et al.*, 2009; Soyer O.U. *et al.*, 2013).

1.1.1 Células reguladoras

En la actualidad, se ha definido una amplia variedad de células reguladoras en distintas poblaciones celulares: células dendríticas (Zimmer A. *et al.*, 2012), células *Natural killers* (NK) (Deniz G. *et al.*, 2013), macrófagos (Ziegler T. *et al.*, 2015), etcétera. De entre todas ellas, cabe destacar el funcionamiento de las células T y células B reguladoras.

1.1.1.1 Células T reguladoras

En situaciones normales, ante la entrada de un antígeno ambiental inocuo, los linfocitos T con función reguladora (Treg) son cruciales para el desarrollo de una respuesta inmune tolerogénica y por tanto, para la inhibición de la respuesta alérgica (Palomares O. *et al.*, 2010; Rudensky A.Y., 2011). En la actualidad, se diferencian varios tipos de células Treg (Figura 1) en relación a su origen, fenotipo y mecanismos de supresión. Por un lado, los linfocitos T reguladores naturales (nTreg), caracterizados por los marcadores de superficie, clúster de diferenciación (CD) 4⁺ (CD4⁺) y CD25^{High}, y el factor de transcripción FOXP3⁺ (*Forkhead box P3*). Estas células se generan en el timo y se incorporan al repertorio linfocitario periférico como linfocitos Treg funcionales o maduros. Por otro lado, los linfocitos T reguladores inducibles (iTreg), que se desarrollan en la periferia tras la estimulación antigénica (Chen W. *et al.*, 2003). Este tipo de linfocitos Treg se ha dividido a su vez en tres tipos de poblaciones: iTreg FOXP3⁺, Tr1 (secretoras de interleucina 10, IL-10) y Th3 (secretoras del factor de crecimiento transformante β , TGF- β) (Palomares O. *et al.*, 2010). Además, se han descrito otros tipos de células Treg como los linfocitos TCD8⁺ que median la tolerancia en enfermedades de origen autoinmune.

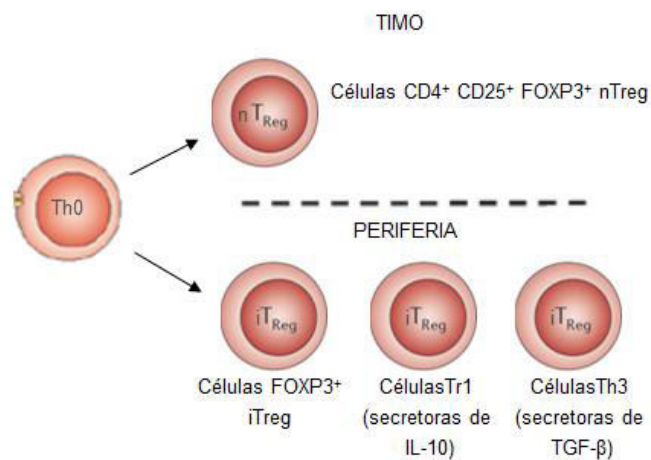


Figura 1. Poblaciones de células Treg. Las células nTreg se generan en el timo. Las células iTreg se generan en la periferia, habiéndose descrito tres subtipos: células FOXP3⁺, células Tr1 y células Th3. Figura adaptada de Palomares O. *et al.*, 2014.

Las células Treg tienen la función de controlar la respuesta del S.I. mediante la secreción de factores solubles o por contacto directo (célula-célula) (Lloyd C.M., Hawrylowicz C.M., 2009; Soyer O.U. *et al.*, 2013). Los principales mecanismos implicados son: la producción de citocinas reguladoras como la IL-10, la IL-35 y el TGF- β ; mecanismos de disrupción metabólica: CD25, adenosín monofosfato cíclico (AMPc), receptor de adenosina 2, receptor de histamina 2, CD39 y CD73; mecanismos mediados por moléculas de superficie con diana en células dendríticas: antígeno-4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), proteína 1 de muerte celular programada (PD-1); y mecanismos

citolíticos como las granzimas A y B (Palomares O. *et al.*, 2014). Las principales funciones potencialmente atribuibles a las células Treg son las siguientes (Figura 2):

1. Promover los tipos de células dendríticas con fenotipo tolerogénico hacia su maduración, disminuyendo la capacidad para potenciar las respuestas Th1, Th2 y Th17 (Wing K. *et al.*, 2008).
2. Inhibir de manera directa la activación de las células Th2 específicas de antígeno, minimizando la producción de las citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Akdis C.A. *et al.*, 1998; Jutel M. *et al.*, 2003; Akdis M. *et al.*, 2004).
3. Inhibir la activación y degranulación de mastocitos y basófilos, suprimiendo la expresión del receptor de alta afinidad para la IgE (FcεRI) y su degranulación mediante interacciones OX40-OX40L, e impedir la infiltración de eosinófilos y células T a los tejidos, tanto por contacto directo como mediante la secreción de citocinas, lo que provoca una disminución de la inflamación local (Kashyap M. *et al.*, 2008; Ring S. *et al.*, 2006; Gri G. *et al.*, 2008; Nonaka M. *et al.*, 2008).
4. Ejercer un efecto directo sobre las células B, suprimiendo la producción de anticuerpos IgE específicos e induciendo la formación de anticuerpos no inflamatorios IgG4 (Meiler F. *et al.*, 2008a).
5. Interactuar con células residentes en el tejido como las células epiteliales bronquiales previniendo el daño tisular e inhibiendo la remodelación del tejido (Gri G. *et al.*, 2008; Nonaka M. *et al.*, 2008).

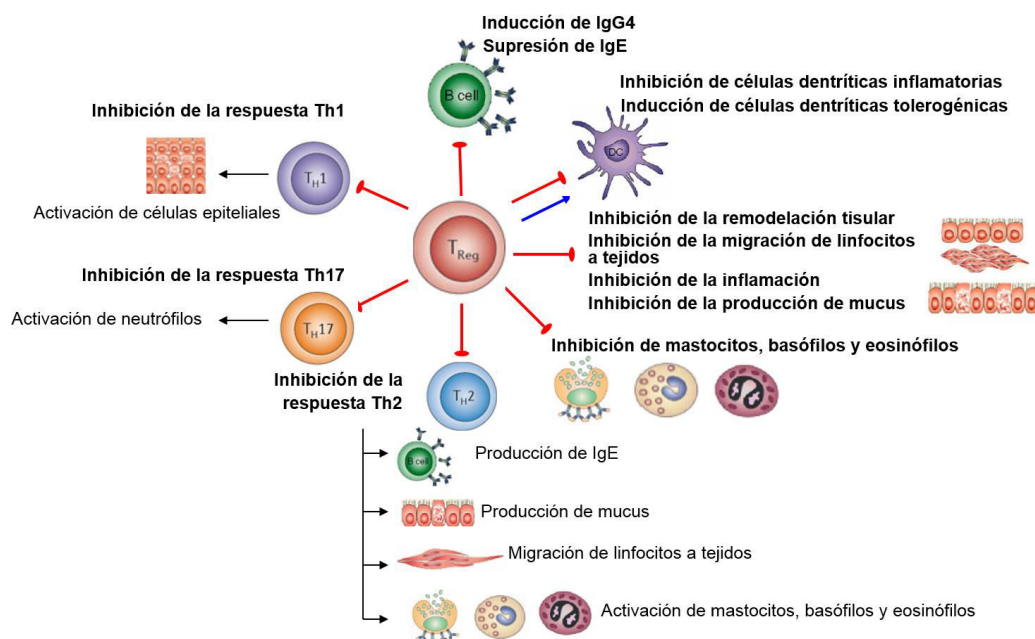


Figura 2. Principales funciones de las células Treg. Las flechas rojas indican inhibición, la flecha azul activación. Figura adaptada de Palomares O. *et al.*, 2010.

1.1.1.2 Células B reguladoras

Recientemente, han surgido nuevas investigaciones que evidencian la importancia de las células B reguladoras (Breg) en la respuesta tolerogénica frente a antígenos extraños (Soyer O.U. *et al.*, 2013). Hasta la fecha, se han descrito múltiples poblaciones de células B reguladoras: Br1, secretoras de IL-10; Br3, secretoras de TGF- β y Breg, que expresan FOXP3. Todas ellas, al igual que las células Treg, ejercen funciones inmunorreguladoras, promoviendo la tolerancia por múltiples mecanismos como la secreción de IL-10 o TGF- β (Noh G., Lee, J.H., 2011) y que, en último término, inhiben la respuesta temprana de las células T, disminuyen la inflamación e inducen el reclutamiento de células Treg (Natarajan P. *et al.*, 2014; Braza F. *et al.*, 2014).

De este modo, las células Breg y Treg actuarían de un modo sinérgico y recíproco promoviendo la tolerancia e impidiendo la respuesta inmune específica de antígeno (Noh G., Lee J.H., 2011).

1.1.2 Citocinas reguladoras

Uno de los principales mecanismos de acción de las células reguladoras es la secreción de mediadores solubles, entre los que destacan las citocinas IL-10 y TGF- β (Tabla 1) (Palomares O. *et al.*, 2014).

1.1.2.1 Interleucina 10 (IL-10)

Esta citocina, formada a partir de dos subunidades de 178 aminoácidos (aa) (18 kDa) (Vieira P. *et al.*, 1991; Zdanov A. *et al.*, 1996), es secretada principalmente por células T, B, monocitos, macrófagos, células dendríticas y mastocitos en forma de homodímero (Nagalakshmi M.L. *et al.*, 2004; Grimbaldeston M.A. *et al.*, 2007). Su receptor está formado por dos cadenas: IL10-R1, que solo se expresa en las células diana (células T, B, NK, monocitos, mastocitos y células dendríticas) e IL10-R2, expresado de forma ubicua. La unión ligando-receptor produce una cascada de señalización a partir de la fosforilación de diversas proteínas que induce la activación, entre otros, del factor de transcripción STAT3. Este gen es el responsable de activar genes proapoptóticos, de disminuir la expresión del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y de promover la expresión de SOCS3 (supresor de la activación de citocinas). Estas activaciones confieren a la IL-10 una importante capacidad inmunosupresora: inhibe la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y la expresión de sus receptores, además de moléculas clave en la presentación de antígenos como las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II en ratón, HLA-II en humanos) y moléculas coestimuladoras (CD80/CD86) en monocitos, macrófagos y células dendríticas. Todo ello provoca la supresión de la proliferación de células TCD4⁺ (De Waal Malefyt R. *et al.*, 1991; Timmann

C. *et al.*, 2004). También puede inhibir de forma directa la proliferación de células T CD4⁺ mediante la supresión de la señal de coestimulación dependiente de CD28 y CD2 (Taylor A. *et al.*, 2007; Oral H.B. *et al.*, 2006).

Su implicación en las respuestas tolerogénicas y alérgicas ha sido ampliamente estudiada. Por ejemplo, se ha demostrado que las células dendríticas procedentes del tracto respiratorio de sujetos sanos, secretan mayores niveles de IL-10 que las de sujetos con síntomas de alergia como rinitis y asma (Palomares O. *et al.*, 2010; Pacciani V. *et al.*, 2010). Por otra parte, distintos ensayos clínicos han observado la restauración de los niveles de secreción de esta citocina por parte de las células Tr1, en respuesta a tratamientos específicos con alérgenos (Akdis C.A. *et al.*, 1998; Francis J.N. *et al.*, 2003; Suarez-Fueyo A. *et al.*, 2014). Además, la sobreexposición a altos niveles de alérgenos, como en el caso del pelo de gato, promueve la secreción de IL-10 por parte de las Tr1, que junto a la mayor secreción de IgG4 se asocia a una mejoría clínica (Platts-Mills T. *et al.*, 2001). Algo similar ocurre en la alergia ocupacional mediada por picadura de abeja, donde se ha demostrado el aumento de la tolerancia debido a la diferenciación y expansión clonal de células Tr1, con la consecuente secreción de IL-10 (Meiler F. *et al.*, 2008b). También se ha demostrado que en respuesta a la caseína, las células Breg, BCD5⁺ de individuos sanos, secretan mayores niveles de IL-10 que los sujetos alérgicos a la leche (Noh J. *et al.*, 2010).

1.1.2.2 Factor de crecimiento transformante β (TGF- β)

La superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) es un grupo integrado por un elevado número de proteínas multifuncionales que afectan a diversos procesos celulares, siendo el TGF- β 1 la molécula prototipo y por tanto, la más estudiada (Li M.O., Flavell R.A., 2008; Alansari A. *et al.*, 2001). Las funciones fisiológicas y fisiopatológicas de esta citocina son extensas, ya que casi todos los tipos celulares pueden secretarla. En lo concerniente al S.I., las principales células que lo producen son las células Treg, más en concreto el subtipo Th3. Esta citocina se secreta en forma de protohomodímero que, para ser funcional, requiere ser activada mediante proteasas (Prieto J. *et al.*, 2002; Sosa-Garros M., Macías-Silva N., 2004). Los receptores para el TGF- β son complejos glicoproteicos heteroméricos transmembranales. Actualmente, se distinguen tres tipos, con diferencias estructurales y funcionales entre ellos (Wakefield L.M., Hill C.S., 2013): los receptores I y II, que son necesarios para la señalización, y el receptor tipo III o betaglicano, no implicado en la señalización pero que podría regular el acceso del ligando a sus receptores, facilitando la interacción del TGF- β con el receptor tipo II. En todo caso, la consecuencia de la interacción ligando-receptor es la activación de cascadas de señalización intracelular que producen la transcripción de genes desencadenantes de los efectos de la molécula.

El TGF- β mantiene la tolerancia periférica ante antígenos extraños inocuos, ya que inhibe la activación de células T y la secreción de anticuerpos por las células B. Asimismo, promueve la diferenciación de células TCD4⁺ en células Treg y la expresión de FOXP3, induciendo mecanismos tolerogénicos como la inhibición de la respuesta proliferativa, diferenciación y supervivencia de células T y B específicas de antígeno (Gorelik L. *et al.*, 2000; Gorelik L. *et al.*, 2002; Heath V.L. *et al.*, 2002). Además, inhibe la maduración de células dendríticas, células de Langerhans y macrófagos (Scadding G.W. *et al.*, 2013; Moingeon P., Mascarell L., 2012) y bloquea la expresión de los Fc ϵ RI en mastocitos (Soyer O.U. *et al.*, 2013). Por otro lado, la expresión de TGF- β por parte de eosinófilos y las células residentes en tejido está involucrada en la remodelación del epitelio de las vías respiratorias y en la fibrosis (Branton M.H., Kopp J.B., 1999).

Tabla 1. Funciones de IL-10 y TGF- β en las células diana.

Célula diana	IL-10	TGF- β
Célula presentadora de antígeno (APC)	Inhibe la maduración de células dendríticas, reduciendo la expresión de MHCII y señales coestimuladoras	Inhibe el desarrollo de células de Langerhans y reprime la expresión del Fc ϵ RI
	Inhibe la presentación antigénica bloqueando la secreción de citocinas de perfil Th1 y Th2	Inhibe la maduración de las APC, la presentación antigénica y la proliferación de células T
Linfocitos T	Inhibición de la proliferación de células Th1 y Th2 específicas de antígeno	Inhibición de la proliferación y diferenciación de células Th1 y Th2 específicas de antígeno
	Bloqueo de las señales coestimuladoras B7/CD28, ICOS y CD2	Promueve la generación de células Treg y Th17
Linfocitos Treg	Promueve la generación del subtipo Tr1, secretor de IL-10	Promueve la generación de células FOXP3 ⁺
Linfocitos B	Promueve la supervivencia	Inhibe su proliferación
	Promueve la generación de anticuerpos de tipo IgG4	Provoca apoptosis de células B vírgenes
	Suprime la secreción de IgE específica de antígeno	Provoca cambio de isotipo hacia IgA
Eosinófilos, mastocitos y neutrófilos	Inhibe su supervivencia, activación y la secreción de citocinas	Suprime la secreción de IgE específica de antígeno
		Promueve quimiotaxis
		Inhibe la expresión de los Fc ϵ RI

Tabla adaptada de Palomares O. *et al.*, 2014.

1.2 RESPUESTA ALÉRGICA

En determinadas situaciones, se produce una pérdida de tolerancia frente a sustancias ambientales inocuas, lo que provoca la activación del S.I. y el desarrollo de una respuesta inmunológica defensiva, inapropiada y exagerada. A ese estado se le conoce como alergia, etimológicamente "reacción extraña", término definido por el Dr. Clemens Von Pirquet en 1906. La molécula que desencadena esta respuesta se denomina alérgeno.

En la actualidad, se desconocen las razones por las que, en algunos sujetos, la exposición a un antígeno tolerogénico ambiental desencadena una respuesta alérgica. Los estudios epidemiológicos muestran que la susceptibilidad personal para desarrollar enfermedades alérgicas, depende por un lado, de la predisposición hereditaria y por otro, de su interacción con los factores ambientales, estos ligados, en gran medida, al modo de vida del sujeto y a su entorno.

La respuesta alérgica o hipersensibilidad de tipo I es una enfermedad que está mediada por la interacción entre el antígeno y los anticuerpos IgE unidos a mastocitos y basófilos, que provocan la liberación de mediadores inflamatorios. Aunque las bases genéticas, moleculares y celulares no están definidas con exactitud, la secuencia de acontecimientos implicados en el desarrollo de la hipersensibilidad puede dividirse en dos etapas: fase de sensibilización y fase efectora.

- **Fase de sensibilización**

Esta primera fase se produce cuando un determinado alérgeno entra en contacto por primera vez con el organismo bien sea ingerido, inyectado o inhalado. En este proceso el alérgeno sufre un doble reconocimiento (Figura 3).

Por un lado, las células presentadoras de antígeno (APC), fundamentalmente células dendríticas, reconocen y procesan el alérgeno. A continuación, migran a la zona T de los ganglios linfáticos adyacentes y lo presentan en superficie en forma de péptidos asociados al complejo principal de histocompatibilidad de clase II. Las células TCD4⁺ vírgenes (Th0) se unen, mediante su receptor (TCR), a este complejo lo que provoca su activación y diferenciación hacia el fenotipo Th2 específico de alérgeno. Estas células Th2 van a producir IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), promoviendo el reclutamiento de mastocitos (IL-4, IL-9 e IL-13) y la maduración de eosinófilos (IL-3, IL-5 y GM-CSF) y basófilos (IL-3 e IL-4) (Holgate S.T. *et al.*, 1999).

Por otro lado, los linfocitos B vírgenes circulantes reconocen al alérgeno íntegro mediante las inmunoglobulinas IgM presentes en su membrana. En el proceso de sinapsis inmunológica, la célula Th2 activa al linfocito B (que haya reconocido previamente el antígeno con sus Ig de superficie) mediante la secreción de citocinas IL-4 e IL-13, y origina el cambio de isotipo hacia IgE y su diferenciación a célula plasmática secretora de IgE. Los anticuerpos IgE producidos tras este primer contacto con el antígeno, pasan a la sangre y se unen a sus receptores de alta afinidad (FcεRI), localizados en la membrana celular de los mastocitos (situados en mucosas y piel) y basófilos (localizados en la sangre). Ambos tipos celulares contienen mediadores cuya liberación dará lugar a los síntomas clínicos de la alergia en la fase efectora. Además, en esta etapa se establece el repertorio de células B y T de memoria específicas del alérgeno.

En este primer contacto con el alérgeno, el individuo no muestra síntomas alérgicos.

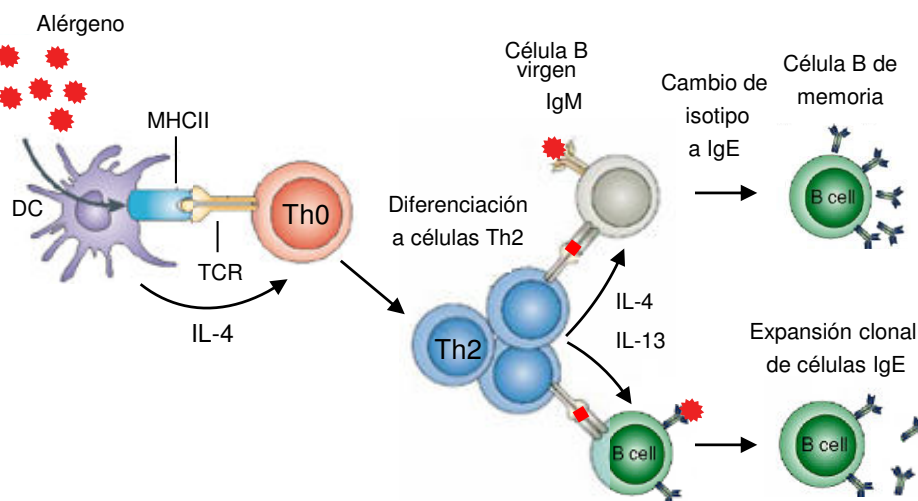


Figura 3. Sensibilización al alérgeno y desarrollo de células B específicas. La diferenciación y expansión clonal de las células Th2 específicas de alérgeno conduce a la producción de IL-4 e IL-13 que inducen el cambio de isotipo de IgM a IgE. El anticuerpo IgE en la superficie de las células B específicas de alérgeno facilita la presentación antigénica. La activación celular en presencia de IL-4 aumenta la diferenciación a células Th2. Figura adaptada de Larché M.Y. *et al.*, 2006.

- **Fase efectora**

Esta fase se divide a su vez en dos, respuesta inmediata y respuesta tardía:

Respuesta inmediata: se produce cuando el alérgeno entra en contacto de nuevo con el individuo sensibilizado. Así, el alérgeno se une a los anticuerpos IgE específicos fijados a los receptores FcεRI de mastocitos y basófilos, provocando el entrecruzamiento de estos complejos y la activación de una cascada enzimática que desencadena la degranulación de estos tipos celulares, produciendo la liberación de aminas vasoactivas (por ejemplo: histamina), mediadores lipídicos (por ejemplo:

prostaglandina D y leucotrienos), ligandos de receptores de quimiocinas CXC (por ejemplo: CXCL8 y CXCL10) y de quimiocinas CC (por ejemplo: CCL2, CCL4 y CCL5) y otras citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13) (Figura 4 A). Esta liberación de mediadores es la responsable de los síntomas clínicos que caracterizan la fase inmediata de la reacción alérgica (broncoespasmo, rinitis, urticaria, diarrea, vómitos y/o anafilaxia), que se manifiestan durante los 30 primeros minutos desde la entrada del alérgeno (Kalesnikoff J., Galli S.J., 2008; Simons F.E., 2010).

Respuesta tardía (Figura 4 B): comienza aproximadamente entre 4-6 horas después de haberse producido la fase inmediata y en ella recae la responsabilidad de la propagación y el mantenimiento de la respuesta inmune adaptativa Th2. Las quimiocinas liberadas durante la respuesta inmediata por las células efectoras, dirigen el reclutamiento de mastocitos, basófilos, eosinófilos y células Th2 específicas de alérgeno a los sitios de entrada del alérgeno, lo que deriva en una inflamación local y daño tisular (Carlson M. *et al.*, 1992). La inflamación crónica, como sucede en el asma bronquial, puede producir lesiones irreversibles, por el desarrollo de fibrosis y remodelado de las vías respiratorias. En su forma más grave, puede llegar a ocasionar la muerte del individuo por obstrucción de las vías respiratorias y colapso cardiovascular, lo que se conoce como choque anafiláctico.

Las manifestaciones clínicas derivadas del proceso alérgico son diversas, ya que dependen del agente causal: ya sean aeroalérgenos, alimentos, medicamentos o veneno por picaduras de himenópteros; y del órgano afectado. Así, en la piel, el contacto con un determinado alérgeno puede producir urticaria o dermatitis caracterizada por la aparición de eritema, angioedema y prurito. En los bronquios producen broncoespasmo, inflamación y aumento de secreciones, característicos del asma, mientras que en la mucosa nasal, producen inflamación y prurito, que originará estornudos, así como aumento de secreción mucosa propio de la rinitis. En el tracto digestivo causa diarrea, vómitos y dolor abdominal, síntomas que aparecen en la alergia alimentaria. En los casos más graves, el alérgeno puede afectar a varios órganos provocando una reacción anafiláctica.

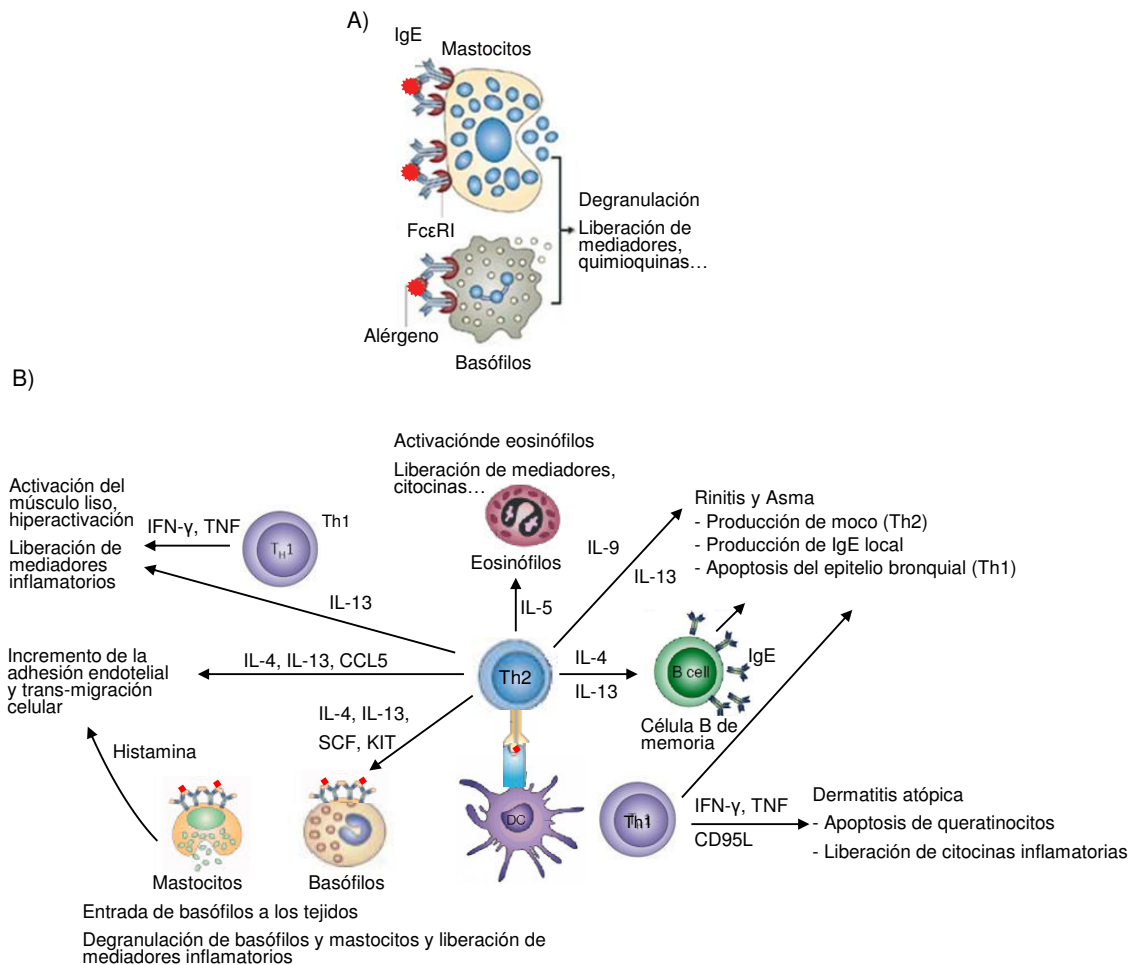


Figura 4. Fase efectora de la respuesta alérgica. A) Respuesta temprana: el entrecruzamiento de los receptores Fc ϵ RI debido a la unión del anticuerpo IgE con el alérgeno, provoca la liberación de histamina, mediadores lipídicos (como la prostaglandina D, factor de activación plaquetario, leucotrienos...), quimiocinas y otras citocinas (IL-4, IL-5, IL-13). Este proceso desencadena los síntomas inmediatos de la enfermedad alérgica. B) Respuesta tardía: bajo la influencia de citocinas y quimiocinas, las células migran al lugar de exposición, donde se reactivan y se produce la expansión clonal. La IgE local facilita la presentación antigénica, incrementando la activación celular. Los eosinófilos son uno de los tipos celulares con mayor capacidad inflamatoria. Las células Th1 producen interferón γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF), contribuyendo a la apoptosis de los queratinocitos, del epitelio bronquial y de las células del músculo liso. Figura adaptada de Larché M.Y. *et al.*, 2006.

1.2.1 Alérgenos

Se denomina alérgeno a aquella proteína o glicoproteína capaz de inducir la producción de anticuerpos IgE específicos en individuos susceptibles de desarrollar una respuesta clínica (enfermedad alérgica) (Pomés A., Villalba M., 1995). Los alérgenos conocidos reciben un nombre sistemático siguiendo la nomenclatura de la *International Union of Immunology Societies* (IUIS): las tres primeras letras indican el género; la siguiente, la especie; y el número, el orden en el que fue descubierto o la importancia clínica que tiene (King T.P. *et al.*, 1994). Por ejemplo, la nomenclatura de los alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* es Der p 1, Der p 2, etcétera.

Aunque las características moleculares que hacen que una determinada proteína sea alergénica no están muy bien definidas, la capacidad de una proteína para inducir una respuesta alérgica se relaciona con su grado de accesibilidad al organismo (Pomés A., Villalba M., 1995). Por ello, deben ser proteínas solubles y estables en fluidos corporales, con un tamaño comprendido entre 5 y 70 kDa, tamaño óptimo para que la molécula sea inmunogénica (mayor de 5 kDa) y pueda atravesar la membrana de las mucosas (límite superior 70 kDa) (Mygind N. *et al.*, 1996). Otras propiedades biológicas como la actividad enzimática, parámetros físico-químicos o modificaciones postransduccionales como la glicosilación, pueden contribuir a aumentar la capacidad alergénica de una molécula (Shakib F., Furmonaviciene R., 2000). Los alérgenos pueden entrar en contacto con el organismo de un individuo por múltiples vías: inhalación (aeroalérgenos), ingestión (alérgenos alimentarios), inyección o por contacto.

Por otro lado, el extracto proteico de una determinada fuente alergénica natural puede contener más de un alérgeno, aunque no todos presentan la misma frecuencia de reconocimiento por parte de los pacientes alérgicos. Este hecho permite clasificarlos como principales o secundarios. Se denomina alérgeno principal a aquel que es reconocido por más del 50% de los pacientes, mientras que si el porcentaje es menor se califica como secundario (King T.P. *et al.*, 1964). Si bien, una determinada fuente alergénica puede contener uno o más alérgenos principales.

1.2.1.1 Epítomos antigénicos

Un alérgeno contiene un número determinado de regiones que producen activación inmunológica, denominadas determinantes o epítomos antigénicos. Estas regiones suelen estar formadas por un número variable de aminoácidos y pueden ser lineales o conformacionales, dependiendo de si los aminoácidos están formando una secuencia continua en la estructura primaria de la proteína o si su proximidad está determinada por la estructura tridimensional de la misma. Para desencadenar la respuesta alérgica, los antígenos sufren un doble reconocimiento: por parte de las inmunoglobulinas (epítomos B) y por parte del TCR (epítomos T), pudiendo coincidir o no en la cadena polipeptídica (Mazur G. *et al.*, 1990; Fehlner P.F. *et al.*, 1991).

1.2.1.1.1 Epítomos B

Estos epítomos han de estar localizados en la superficie del antígeno (Benjamin D.C. *et al.*, 1984) y pueden ser lineales o conformacionales. La molécula alergénica debe contener, al menos, dos epítomos que sean reconocidos por los anticuerpos IgE y poder provocar la activación de las células efectoras. La significación clínica de este reconocimiento no es siempre la misma. Así, puede variar desde producir síntomas clínicos en el primer contacto, hasta no producir ninguna sintomatología

pese a ser reconocido por las moléculas de IgE del individuo sensibilizado. Los anticuerpos IgE de cada paciente pueden reconocer distintos epítomos B (dentro de la misma molécula), diferentes de los que reconozca otro paciente, y pueden reconocer epítomos antigénicos similares en distintos alérgenos con un alto grado de similitud estructural, lo que da lugar a los fenómenos de reactividad cruzada.

La caracterización de estos epítomos se realiza mediante el uso de anticuerpos monoclonales que, utilizados como sondas específicas, permiten evaluar la unión específica epítomo-anticuerpo. Además, el estudio de la estructura tridimensional puede ser de gran ayuda para la identificación de estos epítomos como ya se ha demostrado para los alérgenos Bet v 1 (Gajhede M. *et al.*, 1996) y la profilina del abedul (Fedorov A.A. *et al.*, 1997).

1.2.1.1.2 Epítomos T

Los receptores de linfocitos T (TCR) solo reconocen al alérgeno una vez ha sido procesado y presentado por las APC (mediante las moléculas del MHC-II), por tanto, los aminoácidos que conforman los epítomos T se encuentran continuos en la estructura primaria. Se ha observado que estos epítomos pueden estimular linfocitos T de individuos atópicos y no atópicos, siendo la diferencia entre ellos, el tipo de células T activadas en cada caso (Carbadillo J.M. *et al.*, 1993; Ebner C. *et al.*, 1995).

Las técnicas para su identificación se basan en el conocimiento de la estructura primaria del alérgeno. Una vez determinada, es posible diseñar una serie de péptidos que contengan regiones potencialmente antigénicas y que cubran la secuencia de aminoácidos de la manera más completa posible. La obtención de los péptidos puede realizarse mediante el clonaje de los fragmentos de DNA que codifican esas secuencias o mediante síntesis química. Para la identificación de epítomos T, se evalúa la capacidad de estos péptidos de inducir una respuesta proliferativa por parte de los linfocitos T. Aquellos péptidos que produzcan mayores niveles de proliferación, se identifican como epítomos T (Bungy G.A. *et al.*, 1994; Higgins J.A. *et al.*, 1994; Ebner C. *et al.*, 1993; Schramm G. *et al.*, 1999).

1.2.2 Tratamiento etiológico en las enfermedades alérgicas

Las enfermedades alérgicas constituyen un problema de salud pública a nivel global. Se estima que alrededor de un 30-40% de la población mundial está afectada por una o más enfermedades alérgicas y, durante los próximos años, la Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé una prevalencia aún mayor. Este hecho está provocando un incremento de la demanda sanitaria, con el

consiguiente impacto sobre la salud pública y los recursos sanitarios y económicos. Por tanto, dada la importancia epidemiológica de las enfermedades alérgicas, el desarrollo de tratamientos inmunoterapéuticos que ayuden a la curación de este tipo de enfermedades es un importante reto sanitario a nivel mundial.

1.2.2.1 Inmunoterapia con extractos alérgicos

En la actualidad, la inmunoterapia o vacunación con extractos alérgicos es el único tratamiento etiológico de la enfermedad alérgica (Akdis C.A., Akdis M., 2011). Generalmente, el tratamiento consiste en la administración repetida y gradual, durante varios años, del extracto alérgico frente al que el paciente está sensibilizado, con el objetivo de lograr su tolerancia (Akdis C.A., 2010). Este proceso lleva a la reducción o eliminación de los síntomas que se presentan después de la exposición al alérgeno (Freeman J., 1930; Bousquet J. *et al.*, 1998; Fiandor A., Olalde S., 2008; Sastre J., 2013).

Este tipo de terapia debe utilizarse exclusivamente en enfermedades en las que se haya confirmado un mecanismo alérgico mediado por anticuerpos IgE. Por ello, además de demostrar una sensibilización alérgica mediante pruebas cutáneas o la determinación de anticuerpos IgE séricos específicos, hay que asegurarse de que dicha sensibilización se corresponde con el cuadro clínico que presenta el paciente (Fiandor A., Olalde S., 2008).

Es un método terapéutico que se utiliza desde hace más de cien años. En 1911, Noon y Freeman utilizaron la inmunoterapia para tratar la rinitis alérgica (Noon L., 1911; Freeman J., 1914). Sus ensayos clínicos demostraron que la inyección subcutánea del extracto de polen frente al que los pacientes eran alérgicos, era capaz de inducir tolerancia inmunológica, logrando revertir el curso de la enfermedad. Además, los beneficios de esta inmunización activa se prolongaban alrededor de un año después de la suspensión del tratamiento. La metodología empleada por Noon para el tratamiento de las enfermedades alérgicas fue aceptada por la comunidad científica y, a partir de ese momento, los estudios de las reacciones alérgicas se incrementaron exponencialmente (Cooke R.A. *et al.*, 1935; Loveless M.H. 1940; Malley A., Perlman F., 1969; Bousquet J., Demoly P., 2006; Compalati E. *et al.*, 2009; Burks A.W. *et al.*, 2013).

En general, la administración de la inmunoterapia con extractos alérgicos se divide en dos fases: la llamada fase de iniciación, en la que se administran dosis crecientes del extracto hasta llegar a una dosis máxima, la terapéutica (dosis que produce efecto farmacológico evidente); y la fase de mantenimiento, que consiste en la administración pautada de la dosis terapéutica (Fiandor A.,

Olalde S., 2008). La duración de la inmunoterapia suele ser prolongada (años), aunque depende de la evolución del paciente. Las vacunas disponibles en clínica son de dos tipos, en función de la vía de administración: vacunas subcutáneas y vacunas sublinguales (Burks A.W. *et al.*, 2013; Kucuksezer U.C. *et al.*, 2013).

Las **vacunas subcutáneas (SCIT)** se administran mediante inyección en el tercio medio del brazo, en la misma línea del codo, con jeringas tipo insulina. Normalmente, la fase de iniciación se prolonga de 8 a 14 semanas (con administraciones semanales), siendo la dosis máxima tolerada de 2 a 100 µg del alérgeno mayoritario. Durante la fase de mantenimiento, las vacunas se administran cada 4-6 semanas durante los 3 o 5 años que dura el tratamiento, si bien, en la actualidad estos tiempos se están reduciendo (Calderón M. *et al.*, 2012). Los beneficios clínicos se empiezan a observar transcurridos varios meses desde el inicio de la vacunación, reduciéndose los síntomas progresivamente (Durham S.R. *et al.*, 1999; Norman P.S., 2004). Sin embargo, aunque el porcentaje de eficacia de las SCIT depende de muchos factores, es bastante limitada. Presenta ciertos inconvenientes: molestias originadas por la inyección, la incomodidad que ocasiona el tener que acudir periódicamente a un centro de salud para recibir el tratamiento o la larga duración del mismo. Estos inconvenientes, junto a la posible aparición de efectos adversos (reacciones locales inmediatas/tardías o sistémicas) que conllevan la modificación/anulación de la terapia, representan un obstáculo para su uso indiscriminado (Bousquet J. *et al.*, 1998; Williams A.P. *et al.*, 2004; Akdis C.A., 2006).

Con el fin de solventar estas desventajas, se desarrollaron las **vacunas sublinguales (SLIT)** (Calderón M.A. *et al.*, 2012; Canonica G.W. *et al.*, 2014) que se basan en el hecho de que el epitelio de la región sublingual es muy fino, por lo que la absorción de los fármacos se produce rápidamente. Además, un beneficio añadido es que la mucosa oral alberga una red inmunológica sofisticada que contiene células dendríticas con predisposición a establecer mecanismos tolerogénicos (Novak N. *et al.*, 2011). En esta modalidad, el extracto se administra en forma de gotas o comprimidos, se mantiene bajo la lengua unos minutos y, posteriormente, se traga. Por lo general, la fase de iniciación se prolonga de 4 a 8 semanas, con administraciones diarias o en días alternos, aunque en la actualidad algunos tipos de vacunas empiezan directamente en la fase de mantenimiento (Calderón M. *et al.*, 2012). En esta fase de mantenimiento, las repeticiones se producen con una frecuencia de entre 1 y 3 días, durante un periodo que oscila entre los 3 meses y los 3 años (Lombardi C. *et al.*, 2009).

Los efectos secundarios de la SLIT son menores que la SCIT e incluyen: prurito bucal o bucolabial, sensación de ardor bucolabial, edema, dolores gastrointestinales o diarrea. Las reacciones

sistémicas suelen ser poco frecuentes y no conllevan la suspensión del tratamiento, al contrario de lo que ocurre con la vacuna subcutánea (Gidaro G.B. *et al.*, 2005; Wilson D.R. *et al.*, 2005), lo que la convierte en una terapia muy adecuada incluso para niños (Valovirta E. *et al.*, 2006; Ozdemir C. *et al.*, 2007). Sin embargo, la principal desventaja de la SLIT es que se requieren grandes concentraciones de antígeno, entre 2-400 veces superiores que las habitualmente utilizadas en la forma subcutánea (Ewbank P.A. *et al.*, 2003; Frew A.J. *et al.*, 2006; Moingeon P. *et al.*, 2006), lo que podría ocasionar mayor probabilidad de aparición de nuevas sensibilizaciones.

En los casos de polinosis, la inmunoterapia se puede administrar de forma preestacional (antes de la estación polínica), coestacional (durante la estación polínica), precoestacional (antes y durante la estación polínica) o de manera continuada (durante todo el año, independientemente de la estación polínica). La elección del calendario de vacunación, la duración, la frecuencia del tratamiento y las concentraciones del extracto administradas durante la fase de inicio deben realizarse en función de la seguridad, del beneficio clínico del paciente y de la relación coste-beneficio (Calderón M. *et al.*, 2012), siendo dependientes de la vía de administración.

La valoración de la respuesta a la inmunoterapia se realiza por seguimiento clínico. Las pruebas cutáneas o la determinación de IgE sérica específica no sirven para establecer si una vacuna debe interrumpirse o no. Existe el consenso de que si no hay mejoría clínica tras dos años de inmunoterapia, esta debe finalizar (Fiandor A., Olalde S., 2008).

1.2.2.1.1 Mecanismos de acción

A pesar del beneficio observado en muchos de los pacientes que reciben inmunoterapia, los mecanismos que explican su eficacia son muy complejos y no se conocen en gran medida. La inmunoterapia reduce los síntomas de la respuesta inmediata y de la respuesta tardía, actuando sobre los mecanismos celulares y humorales involucrados en la inflamación alérgica (Figura 5), provocando presumiblemente:

1. Desensibilización temprana de mastocitos y eosinófilos. Tras la primera dosis del tratamiento específico con alérgenos, la capacidad de degranulación de los mastocitos y basófilos disminuye, aun permaneciendo elevados los niveles de IgE. Este hecho puede deberse a la inactivación de los FcεRI. Aunque los procesos que provocan esta desensibilización no están claros, parece que entre otros factores está involucrado el receptor de histamina 2 (Akdis C.A., Akdis M., 2011; Novak N. *et al.*, 2012; Burks A.W. *et al.*, 2013).

2. Cambios en el patrón de la respuesta de las células T específicas de alérgeno, generando células Treg específicas de alérgeno, que secretan mayores niveles de citocinas reguladoras IL-10 y TGF- β , promoviendo la tolerancia frente al alérgeno (Akdis C.A. *et al.*, 1996; Akdis C.A. *et al.*, 1998; Francis J.N. *et al.*, 2003; Jutel M. *et al.*, 2003; Ling E.M. *et al.*, 2004; Nouri-Aria K.T. *et al.*, 2004; Jutel M. *et al.*, 2005; Akdis M., 2006; Radulovic S. *et al.*, 2008; Canonica G.W. *et al.*, 2014). Este cambio de la respuesta se ha asociado a una polarización hacia el fenotipo Th1, lo que provoca un aumento de secreción de interferón gamma (IFN- γ) y una disminución en la producción de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) (Schandane L. *et al.*, 1994; Shim J.Y. *et al.*, 2003).

3. Modulación de la respuesta de anticuerpos específicos de alérgeno. En relación a los anticuerpos IgE séricos específicos de alérgeno, no hay un consenso claro sobre la influencia de este hecho en la mejoría clínica de los pacientes alérgicos. Algunos trabajos han demostrado que la inmunoterapia induce un aumento inicial de los niveles de IgE (Suarez-Fueyo A. *et al.*, 2014), que precede a una disminución gradual a lo largo de meses o años de tratamiento (Van Ree R. *et al.*, 1997; Bousquet J. *et al.*, 1986; Gleich G.J. *et al.*, 1982). Sin embargo, otros autores argumentan que esta disminución de los niveles de IgE es tardía, leve, y no ocurre de manera generalizada (Bahceciler N.N. *et al.*, 2005; Suarez-Fueyo A. *et al.*, 2014). Respecto a la producción de anticuerpos antiinflamatorios, múltiples trabajos han demostrado que la AIT provoca un aumento de los niveles de IgG4 e IgA específicos asociados a una mejoría clínica (Müller U.R. *et al.*, 1989; Flicker S., Valenta R., 2003; Jutel M. *et al.*, 2003; Wachholz P.A., Durham S.R., 2004). En la actualidad se postula que los anticuerpos IgG4 bloquean la respuesta inflamatoria mediante la captura de los alérgenos, en lugar de hacerlo las moléculas de IgE unidas a las células efectoras, impidiendo así, la activación de basófilos y mastocitos. Del mismo modo, competirían con las células presentadoras de antígeno por la captación del alérgeno, dificultando su presentación a los linfocitos T (Aalberse R.C., Schuurman J., 2002; Moingeon P. *et al.*, 2006; Strait R.T. *et al.*, 2006; Van der Neut Kofschoten M. *et al.*, 2007).

4. Disminución del reclutamiento y activación de células proinflamatorias (fase tardía). La respuesta tolerogénica que se desencadena con la AIT, genera cambios en las mucosas y tejidos previamente afectados y se caracteriza por un menor reclutamiento de mastocitos y eosinófilos y una menor secreción de mediadores inflamatorios. Estos cambios se producen a largo plazo y se acompañan de una mejoría clínica del paciente tratado y una posible negativización del alérgeno en las pruebas cutáneas (Creticos P.S. *et al.*, 1985; Rak S. *et al.*, 1988; Van Bever H.P., Stevens W.J., 1989; Passalacqua G. *et al.*, 1999; Jutel M. *et al.*, 2006; Lue K.H. *et al.*, 2006 Canonica G.W. *et al.*, 2014).

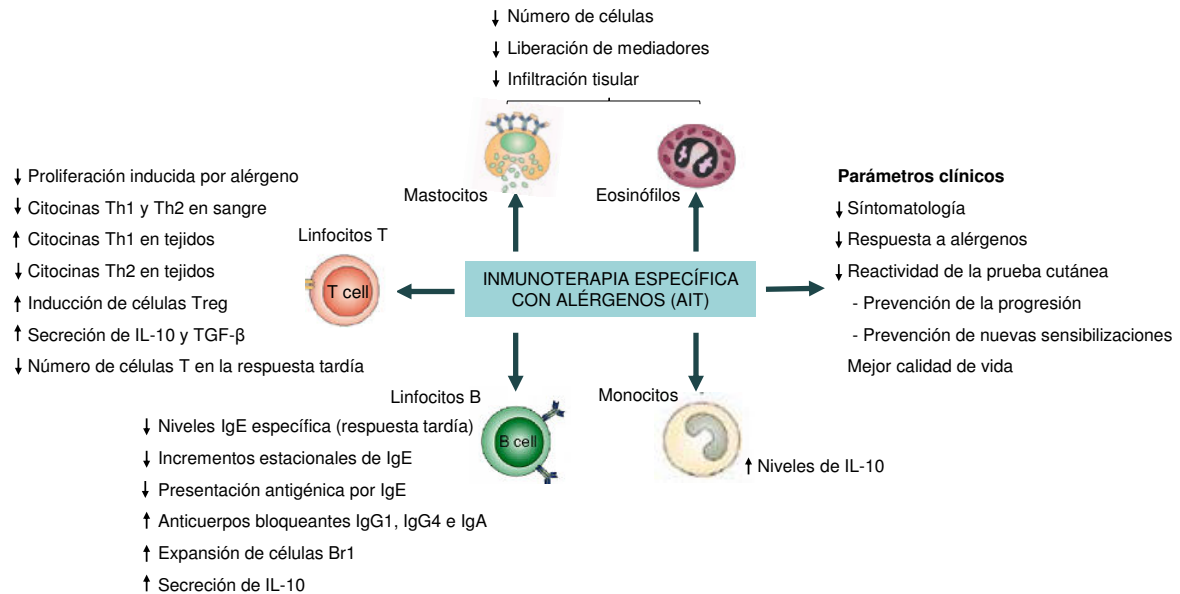


Figura 5. Posibles efectos de la inmunoterapia específica con alérgenos (AIT). La inmunoterapia específica con alérgenos (AIT) está asociada a una mejoría de la tolerancia al alérgeno con un descenso de la inflamación alérgica. La AIT puede modificar la respuesta celular y humoral, cambiando la relación Th1/Th2 e induciendo la activación de células reguladoras, con la consiguiente secreción de las citocinas IL-10 y TGF- β que contribuyen a la función reguladora. También puede provocar el aumento de anticuerpos no inflamatorios IgA, IgG1 e IgG4 y reducir el número de mastocitos, eosinófilos y neutrófilos. Figura adaptada de Larché M. *et al.*, 2006.

1.2.2.1.2 Eficacia

En relación a la eficacia de la inmunoterapia específica con extractos de alérgenos, se han realizado múltiples estudios de metaanálisis para valorarla (Abramson M.J. *et al.*, 1995; Abramson M.J. *et al.*, 2003; Calderón M.A. *et al.*, 2007; Canonica G.W. *et al.*, 2014). Actualmente, el porcentaje de eficacia es muy variable, ya que depende de la sensibilización propia del paciente, de la gravedad de las manifestaciones clínicas y del tratamiento en sí mismo (la dificultad de estandarizar extractos alérgicos provoca gran variabilidad en su potencial terapéutico). Además, algunos autores indican que la eficacia de la AIT podría estar sobrestimada ante la falta de publicaciones científicas con resultados no óptimos (baja eficacia) (Abramson M.J. *et al.*, 1995; Incorvaia C., Frati F., 2011). Por otro lado, debido a la compleja composición de los extractos, estos pueden contener componentes no definidos que provocan nuevas sensibilizaciones y sintomatología alérgica (reacciones locales o incluso choque anafiláctico) (Pomés A., Villalba M., 1995; Bernstein D.I. *et al.*, 2004; Akdis M., Akdis C.A., 2009; Scranton S.E. *et al.*, 2009). Por todo ello, se están investigando nuevas estrategias que mejoren este tipo de tratamiento.

1.2.2.2 Nuevas aproximaciones

Con el fin de minimizar las reacciones adversas y aumentar la eficacia de la inmunoterapia, en la actualidad se buscan nuevas aproximaciones en este ámbito, como son la inmunoterapia complementaria con anticuerpos monoclonales anti-IgE (*Omalizumab*), inmunoterapia basada en secuencias de DNA, con alérgenos recombinantes, con hipoalérgenos o la inmunoterapia con péptidos, entre otras (Marth K. *et al.*, 2014; Akdis M., 2014). Además, se estudian nuevas vías de administración como la vía oral (OIT), específicamente estudiada para alérgenos existentes en los alimentos (Syed A., *et al.*, 2013), la intranasal, bronquial, intralinfática o epicutánea (Akdis C.A., 2012; Senti G. *et al.*, 2008; Agostinis F. *et al.*, 2010; Senti G. *et al.*, 2012, Wang C., Zhang L., 2014). La Figura 6 resume algunas de las nuevas aproximaciones de la inmunoterapia.

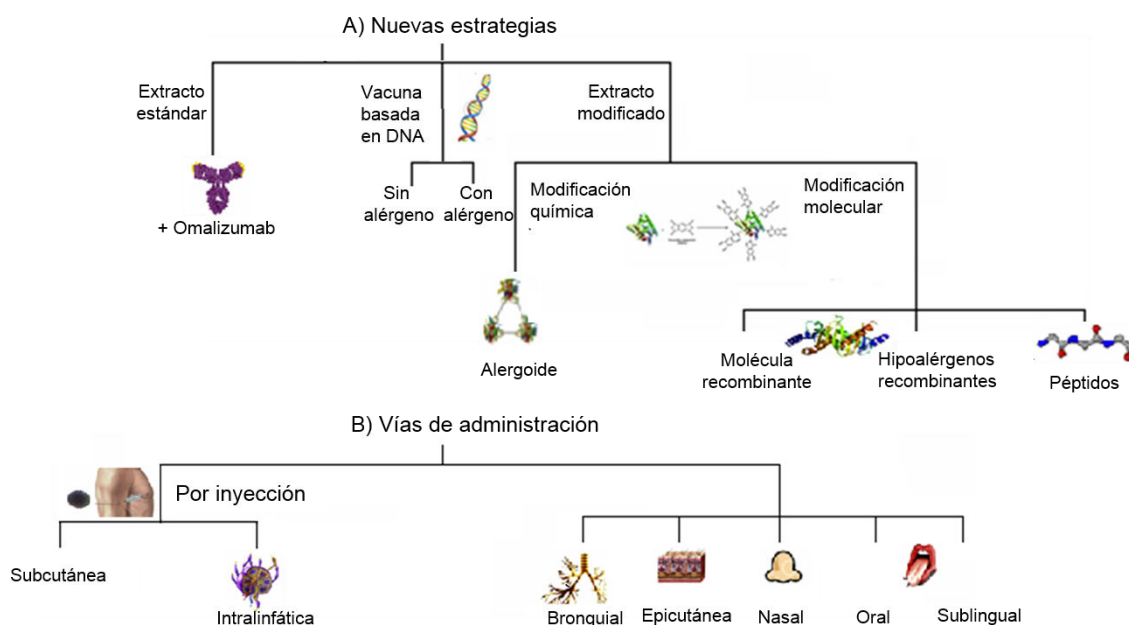


Figura 6. Futuro de la inmunoterapia en la alergia. A) Nuevas estrategias. B) Vías de administración. Figura modificada de Burks A.W. *et al.*, 2013.

Algunas de las nuevas terapias se detallan a continuación:

1.2.2.2.1 Inmunoterapia con extractos y *Omalizumab*

Omalizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado (IgG1 κ) derivado de DNA recombinante que se une selectivamente a los anticuerpos IgE, formando complejos. Así, reduce la cantidad de IgE disponible para unirse a sus receptores fisiológicos (Fc ϵ RI), cuya unión es la responsable de que se desencadene la reacción alérgica (Cavkaytar O. *et al.*, 2014).

Omalizumab representa una nueva y buena alternativa para pacientes con asma alérgica grave no controlada con el tratamiento estándar.

Asimismo, es potencialmente útil en individuos polisensibilizados. Se ha demostrado que, en estos pacientes, la combinación de *Omalizumab* y la inmunoterapia subcutánea aumenta la seguridad y la tolerancia durante las fases de iniciación y de mantenimiento del tratamiento, así como la calidad de vida de los pacientes. Se estima que la combinación de los tratamientos reduce los síntomas en un 48% más con respecto a los pacientes que reciben solo inmunoterapia subcutánea. El tratamiento se administra únicamente a través de la farmacia hospitalaria, lo que requiere la aprobación por parte de la Dirección Médica del hospital donde se trata al paciente. Otro de los principales inconvenientes de este fármaco es su elevado coste (Kuehr J. *et al.*, 2002; Casale T.B. *et al.*, 2006; Massanari M. *et al.*, 2010; Wang C. *et al.*, 2014).

1.2.2.2 Inmunoterapia basada en el DNA

Estas vacunas están basadas en la capacidad inmunoestimuladora de secuencias de oligodeoxinucleótidos procedentes de bacterias, con mayor proporción de dinucleótidos de citosina-fosfato-guanina (CpG) y un menor porcentaje de metilación que las células eucariontes (Bird A.P., 1980). Son, por lo general, hexámeros palindrómicos con la siguiente estructura: 5´purina, purina, C, G, pirimidina, pirimidina 3´, como por ejemplo, 5´GACGTC 3´, 5´AGCGCT 3´ o 5´AACGTT3´ (Yamamoto S. *et al.*, 2000). Se conocen como ISS (oligodeoxinucleótidos inmunoestimuladores) y actúan tanto sobre la inmunidad innata como sobre la adquirida (Burks A.W. *et al.*, 2013).

Los ISS funcionan como ligandos de los receptores del reconocimiento de patrones (PRR) del S.I. innato. Los residuos CpG actúan sobre las APC, principalmente sobre las células dendríticas, pero también sobre macrófagos y monocitos e, inducen en estas, la expresión de moléculas MHC de clase II, la molécula B7 (señal coestimuladora) y la síntesis de IL-12, IFN- α y TNF- α . Estas tres citocinas actúan sobre las células NK induciendo la expresión de IFN- γ . Además, los residuos CpG actúan directamente sobre las células NK induciendo igualmente la síntesis de IFN- γ (citocina de perfil Th1).

En los linfocitos B, los residuos CpG determinan la síntesis de IL-6 e IL-10 e inducen un estado de proliferación y resistencia a la apoptosis que contribuye a la generación de una respuesta inmune mantenida. Además, al aumentar la expresión de moléculas MHC de Clase II y de moléculas B7, aumenta su función como APC.

Sobre los linfocitos T, los ISS actúan de un modo indirecto, ya que su efecto sobre las APC, induce la secreción de citocinas de perfil Th1. Los linfocitos Th1, a su vez, sintetizan IFN- γ , al igual que lo hacen las células NK por el efecto de los ISS, redundando aún más en la potencia del microambiente Th1 (Raz E. *et al.*, 1996; Hsu C.H. *et al.*, 1996; Jurado M.J. 2001; Kobayashi H. *et al.*, 1999). Este efecto Th1, provocado por ISS, puede utilizarse para reconducir una respuesta Th2, característica de la repuesta alérgica y, por tanto, utilizarse en la terapia de esta enfermedad (Horner A.A. *et al.*, 2002). De hecho, ya se han desarrollado varios estudios utilizando los ISS como alternativa terapéutica para combatir la enfermedad asmática (Broide D. *et al.*, 1998), de la rinitis alérgica (Magone M.T. *et al.*, 2000) y en fenómenos de anafilaxia (Horner A.A. *et al.*, 2000).

Para incrementar su potencial terapéutico, los ISS se pueden combinar con el propio alérgeno (nativo o recombinante) en forma de conjugado, lo que favorece la protección frente a posteriores exposiciones al alérgeno, como avalan múltiples estudios (Horner A.A. *et al.*, 2002; Creticos P.S. *et al.*, 2006). La administración intraperitoneal en ratones del alérgeno principal del abedul (Bet v 1) combinado con estas secuencias, indujo una respuesta Th1 caracterizada por altos niveles de IgG2, leve inflamación de las vías respiratorias, altos niveles de IFN- γ y bajos de IL-5 (Jahn-Schmid B. *et al.*, 1999). Algo similar se demostró cuando se administraron con el alérgeno Amb a 1 en ratones y pacientes alérgicos a ambrosía (Tighe H. *et al.*, 2000; Marshall J.D. *et al.*, 2001). En cuanto a la vía de administración de las ISS, se ha comprobado que la vía intranasal es más efectiva que la intradérmica (Takabayashi K. *et al.*, 2003).

1.2.2.2.3 Inmunoterapia con alérgenos recombinantes

Esta terapia se centra en la identificación de las moléculas que están más comprometidas en la respuesta alérgica, a partir de un diagnóstico más específico, permitiendo establecer una inmunoterapia basada en componentes, en la cual se administraría a cada paciente sólo los alérgenos (obtenidos mediante clonación) frente a los que está sensibilizado, evitando así el desarrollo de nuevas sensibilizaciones como sucede con el tratamiento del extracto completo.

Esta técnica ofrece múltiples ventajas, ya que los alérgenos recombinantes tienen características fisicoquímicas y propiedades inmunológicas bien definidas que pueden modificarse para mejorar la eficacia, ajustándose al perfil de sensibilización de cada paciente y permiten la vigilancia y la investigación de sus mecanismos de acción (Cantillo J.F., Puerta L., 2010; Sastre J. *et al.*, 2012; Sastre J. 2013; Marth K. *et al.*, 2014). Así, en un estudio del año 2008 se administró el alérgeno recombinante de polen de abedul Bet v 1 (rBet v 1) a una cohorte de pacientes alérgicos, en la que se observaron niveles de desensibilización similares a los obtenidos con el tratamiento con el

extracto antigénico completo, pero sin presentar los efectos secundarios asociados a la inmunoterapia convencional (Pauli G. *et al.*, 2008). No obstante, con el uso de moléculas recombinantes sin ningún tipo de modificación genética, existe el riesgo de que, durante el tratamiento, se presenten reacciones adversas mediadas por epítomos IgE. Por esta razón, en la actualidad se están realizando nuevos estudios para la obtención de proteínas hipoalérgicas (Cantillo J.F., Puerta L., 2010).

1.2.2.2.4 Inmunoterapia con hipoalérgenos

El uso en inmunoterapia de derivados hipoalérgicos o hipoalérgenos está adquiriendo un gran protagonismo durante los últimos años. Es un tipo de vacunación en el que se utilizan alérgenos modificados que presentan una actividad alérgica (capacidad de la molécula de unir anticuerpos IgE) disminuida o nula, pero conservan su capacidad de estimular a las células T específicas (propiedad necesaria para permitir la modulación de la respuesta inmune). Con este tipo de vacunas, se pretende estimular a los linfocitos T para generar una respuesta protectora sin que los alérgenos sean reconocidos por los anticuerpos IgE, evitando la degranulación de mastocitos y basófilos (Akdis M., Akdis C.A., 2009).

Se conocen dos vías para generar hipoalérgenos. La primera consiste en generar proteínas con estructura terciaria parecida a la natural, pero que no reaccionen con las moléculas de IgE, las cuales se pueden obtener mediante mutagénesis dirigida o clonando isoformas hipoalérgicas existentes en la naturaleza (hipoalérgenos recombinantes). La segunda consiste en la modificación del plegamiento propio de la estructura del alérgeno, lo que destruye los epítomos B, pudiéndose obtener mediante la construcción de proteínas híbridas, alérgenos con estructura primaria invertida y polímeros de alérgenos (Cantillo J.F., Puerta L., 2010).

El uso de hipoalérgenos en inmunoterapia es una estrategia desarrollada, entre otras, en la alergia al grupo 2 de alérgenos de ácaros. Así, se han producido mutantes de Der p 2, Der f 2 y Lep d 2 carentes de algunos de los puentes disulfuro debido a la mutación de cisteínas específicas (Pomés A., Villalba M., 1995).

Este tipo de terapia presenta algunos inconvenientes vinculados sobre todo a la complejidad de las técnicas utilizadas para obtener los alérgenos modificados (fragmentación, delección o mutación).

1.2.2.2.5 Inmunoterapia basada en péptidos

El diseño de vacunas con péptidos derivados de alérgenos es una estrategia basada en el conocimiento de la estructura primaria de los alérgenos (Larché M., 2001; Moldaver D., Larché M.,

2011). Los péptidos diseñados están constituidos por secuencias cortas de aminoácidos que derivan de epítomos B pero que, debido a su pequeño tamaño, tienen poca capacidad para unirse a los anticuerpos IgE o bien contienen epítomos T (Larché M., Wraith D.C., 2005; Larché M., 2007). La administración de dosis crecientes de estos péptidos puede inducir anergia o una respuesta reducida en las células T específicas (Larché M., 2014; Marth K. *et al.*, 2014).

Este mecanismo de inmunoterapia se ha estudiado para distintos tipos de alergia, en concreto, una de las más estudiadas, ha sido la alergia al pelo de gato. Ya en los años 90 se describió que dos péptidos de 27 aminoácidos derivados de Fel d 1 (alérgeno principal) provocaban el aumento de la tolerancia del S.I. (O'Hehir R.E. *et al.*, 1991; Briner T.J. *et al.*, 1993; De Vries J.E., Lamb J.R., 1994; Norman P.S. *et al.*, 1996; Oldfield W.L. *et al.*, 2001; Oldfield W.L. *et al.*, 2002, Haselden B.M., *et al.*, 2001a). El estudio de este tratamiento se ha ido perfeccionando hasta la creación de cat-SPIRE (*Synthetic Peptide Immuno-Regulatory Epitopes*) (Creticos P.S., 2014), consistente en 7 péptidos de entre 13 y 17 aminoácidos, que promueve una mejora de la regulación del S.I., lo cual se asocia a una mejoría clínica. Este mecanismo terapéutico a base de péptidos ha sido estudiado en otras alergias como, por ejemplo, en la polinosis al abedul (*Betula verrucosa*) y en las alergias a ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*) y veneno de abeja (*Apis mellifera*) utilizando péptidos derivados de Bet v 1, Der p 2 y Api m 1, respectivamente (Müller U. *et al.*, 1998; Texier C. *et al.*, 2000; Hoyne G.F. *et al.*, 1993; Bauer L. *et al.*, 1997).

Una de las desventajas de este tipo de vacunas es la poca capacidad inmunogénica de los péptidos. Una técnica para mejorarla consiste en unir los péptidos a la superficie de partículas parecidas a virus (VLP), que son estructuras bastante inmunogénicas, por lo que ofrecen una buena plataforma para favorecer y estimular la respuesta inmunitaria frente a diferentes antígenos (Grgacic E.V., Anderson D.A., 2006). De este modo, se demostró que la aplicación intramuscular y subcutánea en pacientes alérgicos de VLP que contenían epítomos T derivados de Der p 1, inducía una rápida producción de anticuerpos IgG1 e IgG3 pero no IgE; este efecto protector no se observó cuando se aplicaron los péptidos solos (Kündig T.M. *et al.*, 2006).

La inmunoterapia basada en péptidos es una de las aproximaciones más estudiadas en la actualidad por ofrecer múltiples ventajas, como son la facilidad de purificación y estandarización de los péptidos, la reproducibilidad, el bajo coste y la capacidad de administrar grandes dosis sin efectos secundarios adversos (Moldaver D., Larché M., 2011). Sin embargo, aún quedan muchas dudas en su manejo que están siendo ampliamente analizadas, tales como la duración del efecto, la dosis eficaz y la periodicidad del tratamiento, así como qué péptidos utilizar en cada sujeto. Al ser una técnica tan selectiva de epítomo y de antígeno, haría falta sintetizar un gran número de

péptidos diferentes. Además, como el reconocimiento de los mismos es individual y específico habría que determinar qué péptido sería el óptimo, para lo que no valdrían las pruebas cutáneas debido a su pequeño tamaño (Cantillo J.F., Puerta L., 2010).

2 ALERGIA AL POLEN DE OLIVO

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Olea europaea*

El olivo (*Olea europaea*) es un árbol longevo, cultivado por el hombre durante más de 5.000 años para la explotación de su fruto, aceite y madera (Rallo L. *et al.*, 2005). Pertenece a la familia botánica *Oleaceae* que agrupa 29 géneros de los cuales, solo cinco tienen interés económico, hortícola o forestal: *Olea* (olivo), *Ligustrum* (aligustre), *Jazminum* (jazmín), *Syringa* (lilo) y *Fraxinus* (fresno) (Florido F.J., Quiralte J., 2000).

Probablemente procede de Asia Menor, desde donde se extendió por toda el área mediterránea. En el siglo XVI, se introdujo en el continente americano y en el siglo XVII, en áreas de climatología similar, como Australia y el Sur de África (Manousis T., Moore N.F., 1988). En España, el cultivo se concentra mayoritariamente en Andalucía, con casi un 60% de la superficie total cultivada. En concreto, Jaén representa un 25% de la producción nacional. Existen diversas especies de olivo, habiéndose catalogado en España más de 165 variedades, incluida la forma silvestre *Olea oleaster* (Barranco D. *et al.*, 1984).

El polen de olivo es tricolporado, isopolar, con simetría radial, en visión ecuatorial y elíptico en visión polar circular. La superficie es reticulada con lúmenes irregulares. Su tamaño es de 22-25 μm por 20-25 μm lo que le permite permanecer durante semanas en el aire (D'Amato G., Liccardi G., 1994; Subiza F.J. *et al.*, 2007).

La polinización del olivo es anemófila (Morettini A., Pulsell A., 1953). El periodo de polinización oscila según la altitud y condiciones climáticas, aunque suele ser de abril a junio (Wheeler A.W., 1992). La cantidad de polen varía según los factores climáticos anuales, estimándose en el área mediterránea, una concentración media de 100-200 granos/ m^3 (D'Amato G. Liccardi G., 1994), pudiendo alcanzar los 4.500 granos/ m^3 de forma continuada, durante los periodos de producción elevada de polen en zonas con grandes extensiones cultivadas, como Jaén en España o Abulia en Italia. (Macchia L. *et al.*, 1991). No obstante, en días puntuales y en zonas de cultivo intensivo, se pueden alcanzar picos de 10.000-14.000 granos/ m^3 (fuente: SEAIC, <http://www.seaic.org/>).

2.2 CARACTERÍSTICAS DE LA POLINOSIS AL OLIVO

El polen de olivo es una de las causas más importantes de alergia respiratoria en el área mediterránea (Bousquet J. *et al.*, 1985; Wheeler A.W., 1992; Skitarelić N., Skitarelić N., 2009; Esteve C. *et al.*, 2012). En concreto, en España, es la segunda causa de alergia respiratoria tras la polinosis a gramíneas (aproximadamente el 60% de todos los pacientes polínicos están sensibilizados al polen de olivo) y en determinadas zonas de Andalucía, como Córdoba o Jaén, la primera (el 84% de los sujetos polínicos están sensibilizados a este polen), con una mayor prevalencia en adultos que en niños (Liccardi G. *et al.*, 1996).

En 1999, J.F. Florido y colaboradores establecieron que el umbral de polen requerido para mostrar síntomas alérgicos es de 400 granos/m³, muy superior a los 50 granos/m³ descritos para manifestar síntomas en la polinosis a gramíneas (Davies R.R. *et al.*, 1973; Florido J.F. *et al.*, 1999). Sin embargo, estudios más recientes establecen este umbral en los 162 granos/m³ (Brito F.F. *et al.*, 2011).

Esta polinosis se caracteriza por una sintomatología estacional, de abril a junio, aunque existen pacientes que manifiestan síntomas durante todo el año. (Liccardi G. *et al.*, 1996; Blanco C. *et al.*, 1992; Carreira J., Polo F., 1995). La manifestación clínica más frecuente es la rinitis alérgica, caracterizada por una inflamación de la mucosa nasal que provoca picor, estornudos, mucosidad (generalmente acuosa) y congestión que, en la mayoría de los casos, viene acompañada de conjuntivitis (rinoconjuntivitis alérgica) (Liccardi G. *et al.*, 1996). La gravedad de los síntomas es enormemente variable en función del área geográfica y la extensión de olivos cultivada (Bousquet J. *et al.*, 1984; Gioulekas D. *et al.*, 1991) provocando, en regiones con elevados niveles de polen atmosférico, epidemias de exacerbaciones asmáticas, como en Jaén, donde las concentraciones de polen atmosférico varían entre 500 y 1.000 granos/m³, con picos de más de 6.000 granos/m³ a mediados de mayo (Florido J.F. *et al.*, 1999). Sin embargo, el grado de exposición ambiental no parece ser el único factor que influye en el fenotipo alérgico. Los factores genéticos (predisposición genética) parecen ser también determinantes. Se ha demostrado la asociación entre distintos antígenos HLA de clase II y la respuesta IgE específica frente a diferentes alérgenos del polen de olivo, como DR7 y DQ2 con el alérgeno mayoritario de polen de olivo (Ole e 1) y DR2 con Ole e 10, alérgeno mayoritario sólo en áreas con alta carga polínica, asociado a mayor riesgo y gravedad de asma bronquial (Cárdaba B. *et al.*, 1993; Quiralte J. *et al.*, 2005). Además, se ha publicado cómo determinados polimorfismos genéticos están implicados en diferentes fenotipos clínicos, como por ejemplo, los polimorfismos de IL-13, C-1112T (factor de protección) o el R130Q (factor de riesgo). Así como, aunque variantes polimórficas individuales no parecen influir en un fenotipo, su interacción génica sí puede favorecer ciertos fenotipos clínicos, como se demostró en la asociación

entre los polimorfismos (150V/Q551R) del IL4RA y el mayor riesgo de padecer asma bronquial (Cárdaba B. *et al.*, 2007; LLanes E. *et al.*, 2009). La mayor o menor expresión de determinados genes también parece influir en esta respuesta alérgica. Estudios recientes han demostrado que el perfil de expresión de 35 genes en PBMC era capaz de discriminar cuatro condiciones clínicas asociadas a la respuesta frente al polen de olivo respecto a sujetos sanos (Aguerri M. *et al.*, 2013).

2.3 ALÉRGENOS

El patrón de componentes alergénicos (alergograma) del polen de olivo es heterogéneo y muy complejo, ya que contiene un elevado número de proteínas reconocidas por los anticuerpos IgE de los pacientes alérgicos. (Vela C. *et al.*, 1982; Blanca M. *et al.*, 1983; Lahoz C. *et al.*, 1985; Lauzurica P. *et al.*, 1988). Hasta la fecha, se ha demostrado la presencia de, al menos, 20 proteínas con actividad alergénica, de las cuales 12 han sido caracterizadas, de Ole e 1 a Ole e 12, según la nomenclatura de la IUIS (*Internacional Union of Immunology Societies*) (Rodríguez R. *et al.*, 2007; Villalba M., *et al.*, 2014). La Tabla 2 resume las características más importantes de estos alérgenos.

De todos los alérgenos descritos, Ole e 1 es el más relevante y el agente de sensibilización más frecuente (alérgeno principal) (Lauzurica P. *et al.*, 1988; Wheeler A.W. *et al.*, 1990). No obstante, se ha evidenciado que la relevancia clínica de otros alérgenos parece ser dependiente de la carga antigénica ambiental y, por tanto, del área geográfica en la que vive la población sensibilizada (Rodríguez R. *et al.*, 2001; Rodríguez R. *et al.*, 2002; Barber D. *et al.*, 2007; Quiralte J. 2007). Así, los alérgenos Ole e 6, Ole e 7, Ole e 9 y Ole e 10 pueden actuar como principales o secundarios, dependiendo de la región geográfica estudiada (Rodríguez R. *et al.*, 2002; Rodríguez R. *et al.*, 2007; Quiralte J. *et al.*, 2005).

Tabla 2. Alérgenos del polen de olivo. Principales características e implicación clínica.

Alérgeno	Características generales	Implicación clínica
Ole e 1	Glicoproteína ácida PM: 20 kDa (glicosilada); 18,5 kDa (no glicosilada) ^m	Alérgeno más prevalente del polen de olivo (>80% de los pacientes sensibilizados al polen de olivo)
	5-20% del total de proteínas del polen de olivo Función desconocida Presenta homología con alérgenos de otras especies de la familia <i>Oleaceae</i>	Alérgeno principal Marcador de sensibilización primaria a polen de Oleáceas
Ole e 2	Familia de las profilinas PM: 14-16 kDa ^s	Marcador de reactividad cruzada entre pólenes Prevalencia: 24-27%
	Presenta homología con proteínas de diferentes especies de pólenes	Puede asociar SAO (Síndrome Alergia Oral polen-frutas) con frutas y con vegetales
Ole e 3	Familia de las polcalcinas PM: 9,2 kDa ^m	Prevalencia: 20-50%
	Presenta homología con proteínas de diferentes especies de pólenes	Marcador de reactividad cruzada entre pólenes
Ole e 4	PM: 15-18 kDa ^s No homóloga a otras proteínas Función desconocida	Desconocida
	PM: 16 kDa ^s Presenta homología con la enzima superóxido dismutasa de otras especies de plantas Presente en la pulpa del fruto y hojas	Prevalencia variable: hasta 35% Posible reactividad cruzada con la aceituna
Ole e 6	PM: 5,8 kDa ^m Sin homología con otras proteínas	Prevalencia variable: hasta 50%
Ole e 7	PM: 10 kDa ^m Homóloga a las proteínas que transfieren lípidos de otras plantas Escasa reactividad cruzada	Prevalencia variable (20-60%). Alérgeno mayor en zonas de alta exposición Marcador de gravedad: mayor riesgo de presentar anafilaxia por alimentos vegetales y reacciones adversas con inmunoterapia de polen de olivo
	Familia de las polcalcinas PM: 18,8 kDa ^m Proteínas homólogas en pólenes de la familia <i>Oleaceae</i> y <i>Juniperus communis</i>	Reactividad cruzada con proteínas de otros pólenes de la familia <i>Oleaceae</i> y <i>Juniperus c.</i>
Ole e 9	1,3-β-glucanasa glicosilada (PR-2) PM: 46,4 kDa ^m	Prevalencia muy variable (20-60%) Alérgeno principal en zonas de alta exposición
	Región C-terminal homóloga con Ole e 10 Región N-terminal homóloga con proteínas de alimentos y látex	Reactividad cruzada con proteínas de alimentos vegetales y del látex
Ole e 10	Proteína captadora de carbohidratos PM: 10,8 kDa ^m	Prevalencia: 55-79%
	Epítomos comunes con proteínas de pólenes de las familias <i>Oleaceae</i> , <i>Gramineae</i> , <i>Chenopodiaceae</i> , <i>Cupressaceae</i> , <i>Ambrosia</i> y <i>Parietaria</i> , látex y alimentos vegetales	Alérgeno principal en zonas de alta exposición Asociado a mayor riesgo de asma grave Reactividad cruzada con otros pólenes, látex y alimentos vegetales
Ole e 11	Pectina metilesterasa PM: 39,6 kDa ^m	Prevalencia: hasta 55,9-75,6%
Ole e 12	Isoflavona reductasas PM: 33,9 kDa ^m	Desconocida

Los pesos moleculares están determinados por espectrofotometría de masas (m) o SDS-PAGE (s). Tabla adaptada de Orovitg A., 2013 y Villalba. M. *et al.*, 2014.

2.3.1 Ole e 1

Ole e 1 fue el primer alérgeno del polen de olivo descrito (Blanca M. *et al.*, 1983), aunque no se le otorgó ese nombre hasta 1988 (Lauzurica P. *et al.*, 1988). Es la proteína más abundante en el extracto alérgénico, representando hasta el 20% del contenido proteico total (Rodríguez R. *et al.*, 2002). Como ya se ha mencionado anteriormente, se le considera el alérgeno principal del polen de olivo, ya que más del 70% de los pacientes presentan hipersensibilidad a este alérgeno (Lauzurica P. *et al.*, 1988; Wheeler A.W. *et al.*, 1990).

La proteína está formada por 145 aminoácidos (unos 18,5 kDa) y presenta muchas variantes polimórficas. Su secuencia contiene 6 restos de cisteína que originan tres puentes disulfuro (Villalba M. *et al.*, 1993), como se indica en la Figura 7, pudiendo estar heterogéneamente glicosilada en la asparagina (Asn) de la posición 111, lo que origina distintas glicoformas complejas ricas en manosa. Por ello, el peso molecular de la proteína puede variar hasta los 20 kDa (Obispo T.M. *et al.*, 1993; Villalba M. *et al.*, 1993). Este oligosacárido constituye un importante determinante antigénico, siendo capaz de producir liberación de histamina en los basófilos de pacientes alérgicos al polen de olivo (Batanero E. *et al.*, 1994a; Villalba M. *et al.*, 2014).

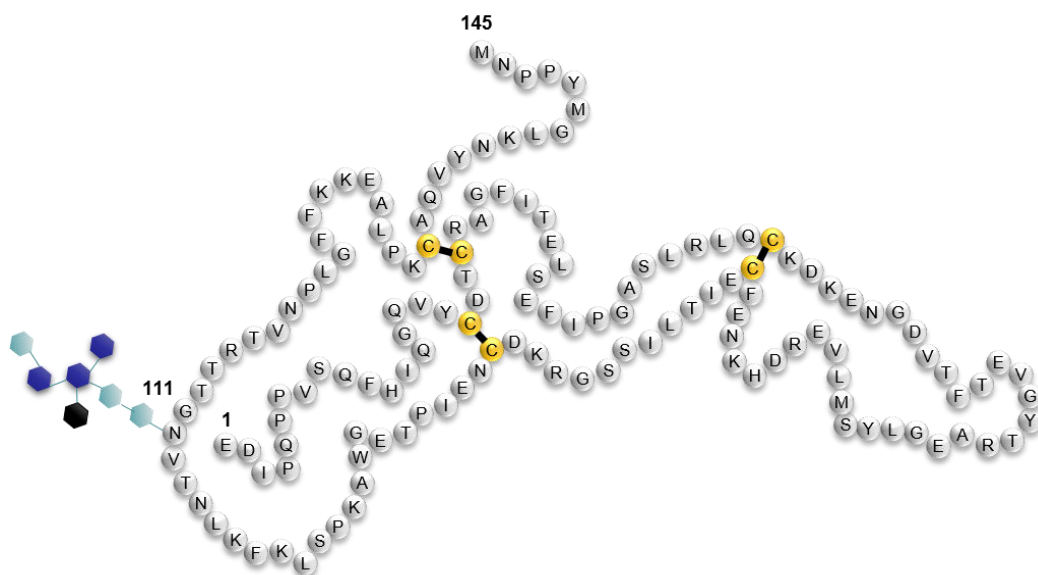


Figura 7. Secuencia de Ole e 1. Secuencia de 145 aminoácidos (Villalba M. *et al.*, 1993). Se indican en amarillo las cisteínas que originan los tres puentes disulfuro en el plegamiento tridimensional de la proteína y la posición de la asparagina (aminoácido 111) susceptible de ser glicosilada. Figura adaptada de Villalba M. *et al.*, 2014.

Ole e 1 se expresa en tejido polínico, aunque no en otros como hojas o fruto. Hasta la fecha no se conoce su función biológica, si bien, por su homología con la proteína LAT52, podría estar

implicado en los procesos de hidratación y germinación del polen y crecimiento del tubo polínico (de Dios Alché J. *et al.*, 1999; Tang W. *et al.*, 2002; de Dios Alché J. *et al.*, 2004).

La importancia del alérgeno Ole e 1 reside también en la elevada similitud (mayor del 80%) que presenta con otros alérgenos de la familia de las oleáceas: Fra e 1 (*Fraxinum*), Lig v 1 (*Ligustrum*), Syr v 1 (*Syringa*) (Rodríguez R. *et al.*, 2007; Martín-Orozco E. *et al.*, 1994; Obispo T.M. *et al.*, 1993; Batanero E. *et al.*, 1994B; Batanero E. *et al.*, 1996; Barderas R. *et al.*, 2005; Barderas R. *et al.*, 2006). Esta homología explica la reactividad cruzada que experimentan los pacientes alérgicos a las oleáceas. Por ello, se le considera como el principal alérgeno de la familia *Oleaceae* y se ha descrito como marcador diagnóstico de la sensibilización al polen de esta familia, así como de otros alérgenos Ole e 1-like como Che a 1 de *Chenopodium álbum*, Lol p 11 de *Lolium perenne*, Pla I 1 de *Plantago lanceolata* y Phl p 11 de *Phleum pratense* (Palomares O. *et al.*, 2006).

Como la generación de una respuesta tolerogénica o alérgica depende del reconocimiento de epítomos antigénicos por parte de las inmunoglobulinas y de los receptores de células T, se han realizado múltiples estudios para definir epítomos B y epítomos T que ayuden a entender la respuesta alérgica, y permitan diseñar nuevas estrategias terapéuticas, siendo este uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral.

2.3.1.1 Epítomos B

Los primeros estudios se desarrollaron en los años 90, a partir de ensayos de competición con anticuerpos monoclonales frente al alérgeno Ole e 1 (Lombardero M. *et al.*, 1992; Martín-Orozco E. *et al.*, 1994). Mediante este tipo de análisis se demostró que Ole e 1 presenta, al menos, cuatro determinantes epitópicos B en su molécula (Martín-Orozco E. *et al.*, 1994). Posteriormente, los estudios de González E.M. *et al.* (2002) empleando isoformas recombinantes de Ole e 1, anticuerpos monoclonales y sueros de pacientes pusieron de manifiesto el carácter conformacional de los epítomos B de Ole e 1. Años después, el uso de péptidos sintéticos solapantes sobre soportes sólidos y fragmentos recombinantes permitió localizar las regiones de unión a IgG e IgE (González E.M. *et al.*, 2006). Empleando un suero policlonal específico de Ole e 1 se identificaron 7 epítomos IgG, en las posiciones: 7-12, 29-34, 55-60, 65-70, 107-112, 119-124 y 134-142. Además, el análisis de los epítomos IgE, empleando sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo, permitió identificar 5 regiones localizadas en las posiciones 1-18, 23-40, 43-76, 101-123 y 131-145 de la secuencia de aminoácidos (González E.M. *et al.*, 2006). Los datos obtenidos señalaron al extremo C-terminal, que abarca la secuencia comprendida entre los residuos 131 y 145, como un epítomo B

inmunodominante, resultados ratificados por el grupo de Valenta en un estudio publicado en 2011 (Twaroch T.E. *et al.*, 2011).

2.3.1.2 Epítomos T

En el año 1998 (Cárdaba B. *et al.*, 1998), se realizó un estudio del mapeo epitópico T de la molécula Ole e 1, en el que se analizó el reconocimiento de péptidos sintéticos derivados de Ole e 1 por parte de linfocitos T de sujetos sanos y alérgicos al polen de olivo, mediante estudios de proliferación en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). En total, se estudió el comportamiento de 15 dodecapéptidos solapantes, que cubrían toda la secuencia de Ole e 1, comprobándose que los péptidos derivados de la parte carboxiloterminales de la molécula de Ole e 1, péptidos 10 (aa91-102), 12 (109-120) y 13 (119-130) eran reconocidos en su mayoría por los sujetos alérgicos. Por ello, fueron calificados como péptidos inmunodominantes. Además, se demostró que estos péptidos no inducían ninguna respuesta de anticuerpos. Por otra parte, los péptidos 2 (aa11-22) y 3 (22-33) fueron en su mayoría reconocidos por los sujetos controles (no sensibilizados a Ole e 1).

Posteriormente, en un estudio piloto de nuestro laboratorio, se analizó la producción de IL-10 (citocina reguladora) en PBMC de pacientes alérgicos e individuos sanos al ser estimuladas con los péptidos 2 y 3, por un lado, y por otro, con los péptidos 10, 12 y 13. Se comprobó que la estimulación con los péptidos 2 y 3 inducía una mayor secreción de IL-10 en los individuos sanos que en los alérgicos al polen de olivo, sugiriendo la posibilidad de usar estos péptidos como alternativa terapéutica (Cárdaba B. *et al.*, 2007).

Todos estos hallazgos, en su conjunto, permitieron calificar a los péptidos 2 y 3 como posibles epítomos inmunomoduladores de la respuesta alérgica.

2.4 MECANISMOS INMUNOLÓGICOS IMPLICADOS

Como ya se ha descrito anteriormente, los mecanismos moleculares reguladores de la respuesta tolerogénica o alérgica frente a un antígeno determinado son complejos. En el caso concreto de la alergia al polen de olivo, se han publicado varios trabajos que intentan comprender qué mecanismos inmunológicos están involucrados.

En 2012, Ayhan Sogut *et al.*, demostraron en muestras de la mucosa nasal (tanto en biopsias como en lavados nasales) que la expresión de FOXP3 (gen implicado en la regulación del S.I.) era menor en pacientes alérgicos a este polen que en individuos sanos, como también lo era la expresión de

T-bet (marcador del fenotipo Th1). La expresión de GATA-3 (gen marcador de la respuesta Th2) fue similar en ambos grupos. No obstante, los ratios T-bet/GATA3 y FOXP3/GATA-3 estaban significativamente disminuidos en los sujetos alérgicos respecto a los controles. En este estudio, se analizaron también los niveles de expresión de citocinas reguladoras (IL-10, TGF- β) no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, al igual que sucedió con la expresión de IL-4. En cuanto a los niveles de IFN- γ , los pacientes alérgicos mostraron menores niveles que los controles (Sogut A. *et al.*, 2012).

Ese mismo año, en un estudio de nuestro grupo (Aguerri M. *et al.*, 2012), se analizó el perfil de citocinas en suero, la expresión de FOXP3 y el porcentaje de células Treg en PBMC extraídas durante y fuera del periodo de polinización, en sujetos sanos y alérgicos al polen de olivo sin tratamiento. En este trabajo, se describió cómo, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de citocinas de perfil Th1 ni Th2 en el suero de ambos grupos, durante el periodo de polinización, los niveles de expresión de FOXP3 eran estadísticamente inferiores en los pacientes alérgicos comparados con los sujetos sanos. Además, junto a estos resultados, se observó una menor presencia de células Treg y una menor secreción de TGF- β en suero. Fuera del periodo de polinización, estos parámetros se recuperaban.

Ambos estudios coincidían en la idea de que los mecanismos reguladores del S.I. (células Treg y secreción de mediadores) que promueven la tolerancia podrían verse alterados en la respuesta alérgica al polen de olivo.

2.5 TRATAMIENTO ETIOLÓGICO

En la actualidad, el tratamiento de los pacientes alérgicos al polen de olivo se basa en la inmunoterapia específica con extractos completos de polen de olivo, en los que el alérgeno Ole e 1, se encuentra en mayor concentración. La principal vía de administración es la vía subcutánea, aunque en la actualidad también se utiliza la vía sublingual (Leonardi S. *et al.*, 2010, Milani M. *et al.*, 2011).

Múltiples estudios han evidenciado la eficacia de estos tratamientos, descubriéndose algunos mecanismos inmunológicos implicados en la mejoría clínica de los pacientes. A continuación se detallan algunos ejemplos:

En un ensayo clínico piloto doble ciego comparado con placebo, se observó que la inmunoterapia con un extracto de *Olea europaea*, tras un año de tratamiento, producía una mejoría clínica de los pacientes debido a la disminución de síntomas nasales y bronquiales. Todo ello se asociaba a una

disminución de los niveles de anticuerpos IgE específicos y a un aumento de anticuerpos IgG4 (González P. *et al.*, 2002).

En un ensayo clínico reciente, en el que pacientes alérgicos al polen de olivo se dividieron en dos grupos, uno con tratamiento específico (AIT administrada de forma subcutánea) (n=19) y otro sin él (n=10), se demostró que, a los seis meses, los pacientes tratados disminuyeron los niveles de expresión de CD40L en linfocitos TCD4⁺ y modificaron el perfil de producción de citocinas: disminución de la IL-4 y aumento de los niveles de IFN- γ , IL-10 y TGF- β 1. Paralelamente a los cambios inmunológicos, se observó una mejoría clínica (Urrea J.M. *et al.*, 2014).

En nuestro grupo (Aguerri M. *et al.*, 2012) realizamos un estudio en el que demostramos que pacientes alérgicos al polen de olivo tratados con inmunoterapia específica (AIT administrada de forma subcutánea) durante más de dos años recuperaban, al menos parcialmente, los mecanismos reguladores alterados en esta enfermedad, ya que mostraron una cuantificación de células T reguladoras (CD4⁺, CD25⁺, FOXP3⁺), mediante microscopía confocal, similar a la encontrada en sujetos sanos y mayor que en los alérgicos sin tratamiento, así como una mayor expresión de FOXP3 que los pacientes alérgicos no tratados.

En otro estudio, se trató a 23 pacientes monosensibilizados a polen de olivo con inmunoterapia preestacional administrada por vía subcutánea, durante 7 semanas, con un extracto modificado (alergoide). Se demostró, *in vitro*, la disminución de la activación específica de basófilos, el incremento de IgG1 e IgG4 específicas asociado a la disminución de síntomas nasales, a la provocación nasal específica y a la reactividad cruzada (Gokmen N.M. *et al.*, 2012).

Sin embargo, no en todos los casos se ha podido demostrar que la mejoría clínica de los pacientes alérgicos tratados, se correlaciona con una recuperación de los mecanismos inmunológicos alterados en la respuesta alérgica. Así, en un estudio con 24 individuos monosensibilizados al polen de olivo, se analizaron las respuestas Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4) y Treg (TGF- β e IL-10) en lavados nasales, antes y después del tratamiento específico (administración vía subcutánea durante 9 meses). Asimismo se analizó la expresión de los genes T-bet, GATA-3 y FOXP3 en biopsias nasales. Los resultados obtenidos no pudieron demostrar que el tratamiento indujera cambios significativos en ninguno de los parámetros estudiados (Kirmaz C. *et al.*, 2011).

En cuanto a la inmunoterapia sublingual específica para el polen de olivo, numerosos ensayos clínicos han demostrado una mejoría de la sintomatología alérgica (disnea, rinitis, conjuntivitis y

asma) (Casanovas M. *et al.*, 1994; Vourdas D. *et al.*, 1998; Leonardi S. *et al.*, 2010; Milani M. *et al.*, 2011).

Por otra parte, distintos estudios han analizado la influencia que puede tener la sensibilización frente a alérgenos menores, en la tolerancia/eficacia del tratamiento con inmunoterapia. Estos estudios tienen una especial relevancia en zonas expuestas a altas concentraciones de polen de olivo, donde la prevalencia de sensibilización a estos alérgenos es superior al 50%, comportándose como alérgenos principales, por ejemplo, Ole e 7, Ole e 9 y Ole e 10.

La sensibilización a Ole e 7 se ha asociado a un mayor riesgo de presentar reacciones adversas con la inmunoterapia (Serrano P., 2007). Además, se ha detectado un grupo de pacientes cuya alergia al polen de olivo se produce a través de otros alérgenos, principalmente Ole e 7, de forma independiente a Ole e 1, (Barber D. *et al.*, 2008) principal componente alérgico de los extractos terapéuticos comercialmente disponibles, lo que podría explicar la falta de eficacia de la inmunoterapia en estos pacientes.

También se ha observado cómo la sensibilización a panalérgenos como profilina o polcalcina, ambas presentes en el polen de olivo (Ole e 2 y Ole e 3, respectivamente) y en otros pólenes de diferentes familias, pueden producir fenómenos de polisensibilización, mediante reactividad cruzada. Estos hechos dificultan al profesional médico el discernir si el polen de olivo es el sensibilizante primario o lo son otros pólenes y, con ello, la elección del tratamiento adecuado para el paciente. Algo similar ocurre con el panalérgeno Ole e 10, perteneciente a la familia denominada *carbohydrate (betaglucan)-binding protein module*, que muestra una importante reactividad cruzada con otros pólenes, látex y alimentos vegetales (Villalba M. *et al.*, 2014).

En resumen, existen diversos estudios en la literatura científica que muestran la eficacia y seguridad de la inmunoterapia específica en pacientes alérgicos al polen de olivo, tanto en la administración sublingual como subcutánea. No obstante, diferentes factores como el grado de cumplimiento del tratamiento, el perfil de sensibilización, el fenotipo clínico o el tipo de exposición ambiental parecen influir en el beneficio clínico del paciente. Además, a pesar de los importantes avances en la mejora de los extractos empleados, se han observado casos de reacciones adversas graves (choque anafiláctico), debido a la administración de inmunoterapia con extractos de polen de olivo (Vovolis V. *et al.*, 2013). Asimismo, existe el riesgo de que los pacientes alérgicos se sensibilicen a otros componentes presentes en los extractos. En consecuencia, el estudio de mejoras en este tipo de vacunas es uno de los objetivos más apremiantes de la investigación en el campo de la alergia.

2.5.1 Nuevas aproximaciones

En el caso de la alergia mediada por polen de olivo y en alergias relacionadas (debido a fenómenos de reactividad cruzada), el conocimiento de la estructura de Ole e 1 y cómo interactúa con las inmunoglobulinas y los TCR en los linfocitos T, ha posibilitado el estudio de nuevas estrategias para la elaboración de vacunas que podrían mejorar los defectos de las actualmente disponibles. En este sentido se estudia el uso de proteínas recombinantes (Rodríguez R. *et al.*, 2007), de hipoalérgenos y de péptidos derivados de Ole e 1.

2.5.1.1 Inmunoterapia con hipoalérgenos

La elucidación de los epítomos B de la molécula de Ole e 1 (Martín-Orozco E. *et al.*, 1994; González E.M. *et al.*, 2006) y la obtención de la molécula de Ole e 1 en la forma recombinante [BB18^(55E56V57G58Y)], obtenido en *P.pastoris* (Huecas S. *et al.*, 1999), ha posibilitado el estudio de hipoalérgenos como herramientas potencialmente útiles en la terapia para la alergia mediada por polen de olivo. Para ello se ha recurrido a 2 vías: por un lado, a la producción de mutantes de Ole e 1, alterando o eliminando las zonas de unión a IgE (un mutante puntual -Y141A- y dos de delección -135Δ10 y 140Δ5-) (Marazuela E.G. *et al.*, 2007) y, por otro, a la producción de un híbrido entre Ole e 1 y su homólogo no alergénico obtenido en *P.pastoris* BB18 OB55-58 (^{55S56D57S58E}). Este híbrido mantiene la capacidad de activar células T específicas en un modelo de ratón alérgico pero presenta una actividad alérgica disminuida, debido a la menor capacidad de unión a las IgE y de activar basófilos en ensayos *in vitro* (Marazuela E.G. *et al.*, 2012).

2.5.1.2 Inmunoterapia basada en péptidos

Otra estrategia en la inmunoterapia es la búsqueda de vacunas seguras usando péptidos no alergénicos derivados de Ole e 1.

El establecimiento de un modelo de ratón alérgico a Ole e 1 que refleja las características típicas de los pacientes alérgicos, ha permitido ensayar 2 protocolos profilácticos basados en la inducción de tolerancia mediante la administración intranasal de péptidos libres o encapsulados (aa109-130 de Ole e 1) (Marazuela E.G. *et al.*, 2008a; Marazuela E.G. *et al.*, 2008b). Estos estudios apoyarían el uso de vacunas nasales como alternativa a la AIT convencional para el tratamiento de la alergia.

En 2011, el grupo liderado por R. Valenta (Twaroch T.E. *et al.*, 2011) realizó otra aproximación en relación a este tipo de estrategia. Sintetizaron 5 péptidos de entre 32-36 aa que cubren toda la molécula de Ole e 1 (Péptido 1: aa1-36, Péptido 2: aa35-68, Péptido 3: aa67-100, Péptido 4: aa85-

120, Péptido 5: aa111-145) y midieron la reactividad que induce cada péptido (tanto a nivel de IgE, IgG y de respuesta de células T) en estudios *in vitro* e *in vivo* (administrando a conejos estos péptidos unidos a hemocianina junto con el adyuvante de Freud). Como resultado, obtuvieron que los péptidos 1 y 2 podrían ser útiles y seguros para el desarrollo de inmunoterapia frente al polen de oleáceas. A este hecho, se suman los datos aportados por la Dra. B Cárdbaba (Cárdbaba B. *et al.*, 1998) que indicaban que esta parte de la molécula de Ole e 1 era la que menor capacidad proliferativa de células T específicas de alérgenos producía, y la que mayor secreción de IL-10 inducía (Cárdbaba B. *et al.*, 2007). Ambos resultados apoyan la hipótesis de que esta región de Ole e 1 podría ser potencialmente utilizable para el desarrollo de una vacuna.

Por otra parte, se están investigando otras estrategias que no implican el conocimiento de la estructura del alérgeno, como es el uso de exosomas tolerogénicos en un modelo de alergia experimental en ratón (Prado N. *et al.*, 2008).

3 NUEVAS HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS

Todas estas aproximaciones utilizadas en la búsqueda de una mejora de la vacuna para la alergia al polen de olivo suponen avances significativos hacia la cura de la enfermedad. Sin embargo, en muchas ocasiones se desconocen los mecanismos genéticos, moleculares y celulares implicados en la mejoría clínica de los pacientes. El avance tecnológico de los últimos años ha permitido abordar el estudio de enfermedades complejas como las alergias, desde una nueva perspectiva. Las nuevas plataformas y técnicas que permiten el estudio a nivel global del DNA (Genómica), expresión génica (Transcriptómica), proteínas (Proteómica), SNP (GWAS, *Genome-wide association study*) de muestras de distinta procedencia, abren múltiples posibilidades para poder identificar nuevos mecanismos moleculares implicados en una determinada enfermedad que permitan mejorar el diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento terapéutico. Estas técnicas abren un campo de estudio real hacia la medicina personalizada, en el que se puede diseñar el análisis de múltiples factores hasta ahora difícilmente explorables de forma simultánea.

3.1 USO DE MICROARRAYS EN ALERGIA

En la actualidad, el uso de los *microarrays* de proteínas en la enfermedad alérgica es un complemento diagnóstico que permite identificar el perfil de sensibilización de un paciente.

Mediante esta técnica, se mide la presencia de anticuerpos IgE específicos frente a una batería de moléculas inmunogénicas (perfectamente caracterizadas). Este diagnóstico molecular es mucho más preciso que los análisis convencionales, que se efectúan a partir de extractos alérgicos completos, lo que permite adecuar el tratamiento a cada paciente (Sastre J., 2013).

Por otra parte, los *microarrays* de expresión génica permiten evaluar la expresión génica diferencial entre sujetos sanos y pacientes, antes o después de un tratamiento, con el objetivo de encontrar nuevos genes implicados en el diagnóstico o el tratamiento de la enfermedad. Aunque esta tecnología se ha utilizado mayoritariamente en la investigación frente al cáncer, puede ser muy útil en otras enfermedades complejas. De hecho, a pesar de no haber sido aún muy utilizada en el área de las enfermedades alérgicas, actualmente se considera de gran utilidad para encontrar nuevas vías de actuación, como lo demuestran trabajos recientes (Chamberland A. *et al.*, 2009; Benson M. *et al.*, 2009; Jones S.M. *et al.*, 2009; Dorsam G.P. *et al.*, 2010; Bruhn S. *et al.*, 2012). La primera revisión de *microarrays* en enfermedades alérgicas (Benson M. *et al.*, 2004) describía cómo algunos trabajos pioneros identificaron una combinación de genes que permitía diferenciar sujetos asmáticos y controles sanos con una mayor eficacia que el estudio de los niveles de IgE (Brutsche M.H. *et al.*, 2002). Destacaban además la posibilidad de identificar grupos de genes funcionalmente relacionados, en vez de genes a nivel individual. Posteriormente, avances muy interesantes en las enfermedades alérgicas se han asociado con estudios que han utilizado *microarrays* (Cárdaba B. *et al.*, 2012). Destacan tres tipos principales de avances:

- El descubrimiento y verificación de genes diferencialmente expresados con la descripción de múltiples biomarcadores potenciales o dianas terapéuticas que están siendo validadas (Hansel N.N. *et al.*, 2008; Sääf A.M. *et al.*, 2008; Izuhara K., Saito H., 2006; Schreffer W. *et al.*, 2005, Tyner J.W. *et al.*, 2006; Woodruff P.G. *et al.*, 2007; Jones S.M. *et al.*, 2009).
- La posibilidad de encontrar patrones moleculares asociados a fenotipos clínicos, como ha sido demostrado en asma, donde se han descrito, al menos, dos fenotipos distintos definidos por el grado de inflamación Th2 (Woodruff P.G. *et al.*, 2009).
- La posibilidad de encontrar rutas desreguladas mediante el análisis de módulos que involucran genes que interactúan entre sí, normalmente relacionados funcionalmente. Esta aproximación identificó el papel inhibitorio de IL7R en la inflamación alérgica (Mobini R. *et al.*, 2009).

Todos estos avances permiten, por un lado mejorar el diagnóstico y por otro, descubrir nuevas vías implicadas en la clínica del paciente y por tanto, potenciales dianas terapéuticas y, en consecuencia, mejorar el tratamiento en este tipo de patologías.

OBJETIVOS

La alta prevalencia de la alergia a pólenes y la ausencia de una vacuna eficaz que mejore la sintomatología clínica de los pacientes afectados, ha generado un gran interés científico en la búsqueda de nuevas formas de inmunoterapia que permitan curar estas enfermedades. En este sentido, las vacunas diseñadas a base de péptidos derivados de alérgenos, se postulan como una de las estrategias más prometedoras. Sin embargo, en muchas ocasiones, se desconocen los mecanismos genéticos, moleculares y celulares que median su actuación. El avance científico-técnico y el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas están permitiendo la mejor comprensión de estos mecanismos.

El objetivo global de esta Tesis Doctoral es estudiar *in vitro*, la respuesta específica de alérgeno en la alergia al polen de olivo y el potencial terapéutico de distintos péptidos derivados de Ole e 1, alérgeno principal involucrado en esta polinosis, con el fin de definir mecanismos inmunológicos reguladores implicados y nuevas dianas terapéuticas.

Para ello, se obtuvieron los sueros y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 5 grupos clínicos de una población relacionados con la polinosis al olivo, en dos momentos de exposición polínica (alta y baja concentración de polen). Las PBMC se cultivaron en ausencia/presencia del extracto completo de polen de olivo o de péptidos sintéticos, correspondientes a las regiones de aminoácidos 11-22, 22-33, 91-102, 109-120 y 119-130 de Ole e 1, planteándose los siguientes objetivos concretos:

1. Identificar en la población perfiles séricos diferenciales analizando los niveles de IgE total y anticuerpos IgE específicos frente al polen de olivo.
2. Establecer entre los grupos clínicos, perfiles diferenciales de secreción de citocinas y de expresión génica a partir de las PBMC cultivadas en ausencia de estimulación.
3. Evaluar si los estímulos modifican la secreción de citocinas y la expresión génica de las PBMC cultivadas, realizando comparaciones inter- e intragrupo.
4. Analizar la capacidad de los péptidos de modular la proliferación celular en respuesta al extracto completo de polen de olivo, en los sujetos alérgicos sin tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

El estudio planteado es un diseño tipo casos-controles que cumple con los principios éticos de la Declaración de Helsinki.

La población estudiada estuvo formada por 84 sujetos voluntarios clasificados en cinco grupos clínicos:

- Grupo 1: Sujetos no alérgicos: n= 17.
- Grupo 2: Sujetos asintomáticos: n= 10.
- Grupo 3: Sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo: n= 20.
- Grupo 4: Sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento: n= 22.
- Grupo 5: Sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con inmunoterapia específica (AIT): n= 15.

1.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN

Los sujetos seleccionados para este estudio debían cumplir una serie de criterios previamente establecidos: tener un rango de edad adecuado (10-70 años), haber residido más de 10 años en la zona de exposición al alérgeno (Andalucía), no ser fumador, no estar en tratamiento con corticoides o antihistamínicos que pudieran alterar los parámetros a determinar y haber firmado el consentimiento de participación en el estudio (previamente aprobado por el Comité Ético de todos los centros integrantes del estudio).

1.2 CLASIFICACIÓN DE LOS SUJETOS

El reclutamiento y la clasificación de los sujetos se realizó en los Departamentos de Alergia de cuatro hospitales de Andalucía (Hospital Universitario San Cecilio de Granada, Hospital General de Especialidades de Jaén, Hospital Policlínico de Sevilla y Hospital Civil de Málaga) en base al historial clínico y a criterios diagnósticos a dos niveles: exploración clínica y pruebas cutáneas.

Exploración clínica: Se evaluó la ausencia o presencia de sintomatología alérgica, principalmente asma y/o rinitis, en cada uno de los sujetos de estudio.

Pruebas cutáneas: Se realizaron mediante la prueba del prick que permite diagnosticar frente a qué sustancia está sensibilizado un determinado individuo. Para ello se aplican gotas de extractos alergénicos comunes y estandarizados (ALK-Abelló, Madrid, España) de *Olea europaea*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blattella germanica*, epitelio de perro y gato, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Lolium perenne*, *Cynodon dactylon*, *Cupressus sempervirens*, *Platanus acerifolia*, *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium album*, *Salsola kali* y *Parietaria judaica*, sobre la superficie volar de ambos antebrazos. Como control negativo se usa una solución de suero fisiológico y como control positivo, histamina. Posteriormente, con lancetas (ALK-Abelló, Madrid, España) se hace una punción a través de cada gota y se inserta en la epidermis. Transcurridos 20 minutos, las pápulas con un diámetro superior a 3 mm respecto al control negativo se valoraron como reacciones cutáneas positivas, lo que indica sensibilización inmediata frente a esa sustancia. Según las recomendaciones de la EAACI (*European Academy of Allergy and Clinical Immunology*) (EAACI, 1989; Dreborg S., Frew A., 1993), en el momento de la prueba, los sujetos de estudio debían haber retirado cualquier medicación que pudiese influir en el resultado (antihistamínicos y corticoides tópicos en la zona), además de no presentar ningún trastorno cutáneo en la zona de aplicación.

En base a estos criterios se establecieron los siguientes grupos de estudio:

- **Sujetos no alérgicos.** Se clasificaron en este grupo todos aquellos individuos que no presentaban sintomatología alérgica, ni historial de enfermedades respiratorias y que presentaron un resultado negativo en las pruebas cutáneas frente a la batería de extractos alergénicos descrita.
- **Sujetos asintomáticos.** Los sujetos asintomáticos estaban sensibilizados al polen de olivo, ya que presentaron test cutáneo positivo al extracto, pero no presentaban sintomatología alérgica (ni rinitis ni asma).
- **Sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo.** Individuos con sintomatología alérgica que presentaron pruebas cutáneas positivas a alguno de los siguientes extractos alergénicos: ácaros, epitelios de animales (perro y gato) y/o pólenes, pero en ningún caso presentaron reacciones cutáneas positivas al extracto completo de polen de olivo. En este grupo también se incluyeron a individuos alérgicos a medicamentos y a aquellos que presentaban reacciones a picaduras de insecto.

- **Sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.** Los individuos alérgicos al polen de olivo referían rinitis estacional y/o asma durante la exposición al antígeno (de abril a junio). En las pruebas cutáneas, presentaron reacciones positivas al extracto de *O. europaea* (algunos presentaron también reacciones cutáneas positivas a otros extractos alérgicos). Este grupo de sujetos nunca había recibido tratamiento para esta enfermedad.
- **Sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con inmunoterapia específica de alérgeno (AIT).** Estos sujetos fueron diagnosticados como alérgicos al polen de olivo con anterioridad. En el momento de la obtención de las muestras, estaban recibiendo, durante al menos dos años, un tratamiento de inmunoterapia subcutánea para el polen de *O. europaea* con extractos estandarizados [ALK-Abelló, CBF-Leti (Barcelona, España) o Bial-Aristegui (Bilbao, España)] en los que el alérgeno mayoritario (Ole e 1) se encontraba en la mayor concentración. Estos pacientes presentaron mejoría clínica según los criterios establecidos por los alergólogos.

1.3 NOMENCLATURA DE LOS SUJETOS

La nomenclatura utilizada para identificar a cada sujeto de estudio viene determinada de la siguiente manera: letra (G, J, M ó S), número (1, 2, 3, 4 ó 5), número (1-22):

- La letra identifica el hospital en el que se realizó el diagnóstico y la recogida de muestras: La letra G corresponde al Hospital Universitario San Cecilio de Granada; la letra J hace referencia al Hospital General de Especialidades de Jaén; la letra M, al Hospital Civil de Málaga y la letra S, al Hospital Policlínico de Sevilla.
- El primer número se refiere al grupo de estudio al que pertenece el sujeto: 1. Sujetos no alérgicos, 2. Sujetos asintomáticos, 3. Sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo, 4. Sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento, 5. Sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con AIT.
- El último número identifica a cada sujeto dentro de cada grupo según el orden de llegada al Centro Sanitario.

Por ejemplo: J.4.1. Es un paciente diagnosticado en el Hospital General de Especialidades de Jaén que pertenece al grupo 4 (sujetos alérgicos al polen de olivos in tratamiento), reclutado en primer lugar.

1.4 RECOGIDA DE MUESTRAS

A cada uno de los sujetos de estudio se le extrajeron 30 ml de sangre completa, recogidos en dos tubos Vacuette con heparina de 10 ml (Grenier bio-one, KremsmÜster, Austria), y un tubo Vacuette sin anticoagulante de 10 ml (Grenier bio-one) destinado para la obtención del suero.

Las muestras se obtuvieron en dos periodos diferentes en función de la carga de polen de olivo en el ambiente:

- Periodo 1: abril-junio del 2006, periodo de polinización del olivo.
- Periodo 2: octubre-diciembre del 2006, fuera del periodo de polinización.

Cada muestra se envió en el menor tiempo posible (a temperatura ambiente), junto con los consentimientos informados y los historiales clínicos, al Departamento de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz para su procesamiento.

2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

2.1 OBTENCIÓN DE SUERO

La muestra de sangre sin anticoagulante se centrifugó durante 10 minutos a 2.100 g en una centrífuga *Allegra X-15R* (Beckman Coulter, Brea, California, Estados Unidos) para obtener el suero de los pacientes, el cual se distribuyó en alícuotas de 1,5 ml y se almacenó a -80°C en el Biobanco del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD). El suero se utilizó para cuantificar los niveles de IgE.

2.2 AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC)

Este proceso se realizó en condiciones estériles, en una cabina de flujo laminar (Cultek, Madrid, España). El aislamiento se realizó mediante un gradiente de densidad utilizando la solución *Lymphocytes isolation solution* (Comercial Rafer, Zaragoza, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Según el cual, cada muestra de sangre periférica heparinizada se mezcla de forma homogénea con un volumen igual de suero salino isotónico al 0,9% (SS) en un tubo estéril. Posteriormente, se añade lentamente la mezcla de sangre y SS a la solución de aislamiento de linfocitos (*Lymphocytes isolation solution*) siguiendo una proporción 5:3 en un tubo de 50 ml, para después, centrifugar las muestras a 460 g durante 20 minutos sin freno, en una centrífuga *Allegra*

X-15R (Beckman Coulter). Este proceso permite obtener distintas fases bien diferenciadas. La parte superior de color amarillento es el plasma. En la parte central, formando un anillo blanquecino, se obtienen las PBMC. En el sedimento inferior se sitúan las células de la serie roja (eritrocitos, plaquetas) y granulocitos (Figura 8). Se recoge la franja que comprende las PBMC y se lavan con 50 ml de SS centrifugando a 675 g durante 10 minutos en una centrífuga *Allegra X-15R* (Beckman Coulter).

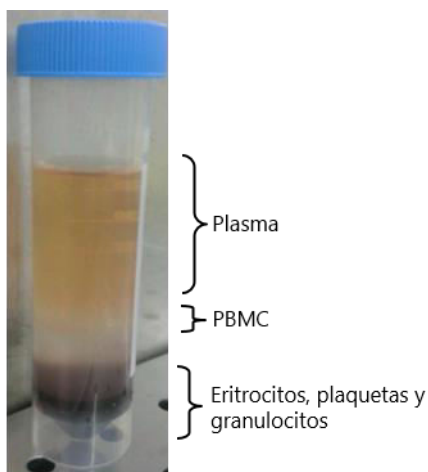


Figura 8. Fraccionamiento de sangre completa por gradiente de densidad.

Las PBMC aisladas se cuentan utilizando una técnica de tinción por exclusión mediante el colorante azul tripán. Las células viables, con membrana intacta, no incorporan el azul tripán, por el contrario, sí atraviesa la membrana de las células muertas y aparecen coloreadas en el microscopio. Según el protocolo, se mezclan 10 μl de las células resuspendidas en SS con 10 μl del colorante azul tripán 0,4% (Gibco, Carlsbad, California, Estados Unidos). Diez μl de esta mezcla se aplican en una cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania) que contiene cuatro cuadrantes de 16 cuadrados cada uno. Se cuentan las células presentes en dos de los cuadrantes, utilizando un microscopio óptico *Labophot* (Nikon, Tokyo, Japón) con un aumento de 40x. Para calcular el número total de células viables se procede según los cálculos:

$$\text{Volumen de 1 cuadrante de 16 cuadrados} = 0,1 \text{ mm}^3$$

$$\text{Número de células en dos cuadrantes} \times 10^4 = \text{células/ml}$$

$$\text{Células/ml} \times \text{Volumen total (Vt)} = \text{Número total de células}$$

La viabilidad se calcula de la siguiente manera: Viabilidad (%) = $100 \times \frac{\text{células no coloreadas}}{\text{total de células (células no coloreadas + células azules)}}$.

Las PBMC aisladas se resuspenden en una solución de congelación que contiene el Medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) (Lonza, Verviers, Bélgica), 10% de suero de ternera fetal (Lonza) inactivado (30 minutos a 56°C) y dimetilsulfóxido al 10% (DMSO, Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, Estados Unidos) a una concentración de 7-10.10⁶ células/ml en viales de criocongelación de 1,5 ml (Sterilin, Cambridge, Reino Unido). Las células se mantuvieron un mínimo de 24 horas a -80°C y posteriormente se guardaron a -196°C en Nitrógeno líquido, hasta su uso. Las células, al igual que el resto de muestras obtenidas, se almacenaron en el Biobanco del IIS-FJD.

3 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE IgE TOTAL Y ANTICUERPOS IgE ESPECÍFICOS FRENTE AL EXTRACTO COMPLETO DE POLEN DE *Olea europaea* EN SUERO

Los niveles en suero de IgE total se determinaron por inmunoanálisis enzimático comercial CAP IgE (Phadia, Uppsala, Suecia) empleando el autoanalizador ImmunoCAP 250 (Phadia). Los anticuerpos IgE específicos frente a *Olea europaea* se determinaron por UNI-CAP (Phadia).

Los niveles de IgE total se expresan en Unidades Internacionales por mililitro (UI/ml) y los niveles de anticuerpos IgE específicos en kilo Unidades Arbitrarias por litro (kUA/l).

4 ENSAYOS DE ESTIMULACIÓN DE LAS PBMC

4.1 ESTÍMULOS UTILIZADOS

En este estudio se seleccionaron dos tipos de estímulos. Por un lado, el extracto completo de polen de *Olea europaea*, al que se le otorgó el nombre de Olea, en el que la proteína mayoritaria presente en el extracto corresponde a Ole e 1 (alérgeno principal del polen de olivo), y por otro, para analizar la posible modulación de la respuesta alérgica, se seleccionaron péptidos derivados de Ole e 1, definidos previamente por nuestro laboratorio: los péptidos calificados como 2 (aa11-22) y 3 (22-33), reconocidos con una mayor frecuencia por sujetos no alérgicos no coincidentes con los epítomos B y por lo que podrían actuar como epítomos inmunomoduladores y los péptidos 10 (aa91-102), 12 (aa109-120) y 13 (aa119-130), previamente definidos como inmunodominantes (Cárdaba B. *et al.*, 1998; Cárdaba B. *et al.*, 2007).

4.1.1 Purificación del extracto de polen de *Olea europaea*

El extracto se preparó resuspendiendo el polen de olivo (5% p/v), Allergom AB (Suecia), en bicarbonato amónico (50 mM, pH 8.0) con fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM. Tras homogeneizar

la suspensión, se somete a 1 hora en agitación a T^a ambiente (para favorecer la extracción proteica), tras lo cual, se centrifugó a 12.000 g, a 4°C, durante 20 minutos. Se recogió el sobrenadante y sobre el precipitado, se repitió dos veces el proceso de extracción. Finalmente, se juntaron todos los sobrenadantes obtenidos y se dializaron frente a la solución de bicarbonato utilizada. El extracto así obtenido, se filtró, liofilizó y se almacenó a -20°C hasta su uso. La determinación de proteínas totales se realizó mediante el método de Bradford.

Para realizar los ensayos celulares, el extracto Olea se resuspendió en medio RPMI-1640 (Lonza, Verviers, Bélgica) a una concentración de 1 mg/ml y se esterilizó mediante filtración, con filtros de 0,22 µm (Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Irlanda).

4.1.2 Síntesis de los Péptidos

Los Péptidos utilizados para los ensayos de estimulación fueron 5 dodecapéptidos (Tabla 3), sintetizados por el Dr. J.P. Albar en el Centro Nacional de Biotecnología de Madrid, usando la estrategia Fmoc. Estos péptidos se diseñaron utilizando como secuencia de referencia la molécula de Ole e 1 (Villalba M. *et al.*, 1993) (Figura 9). La concentración y pureza de determinó por cromatografía líquida en fase reversa.

Tabla 3. Secuencias de los Péptidos utilizados.

Nº Péptido	Región (aminoácidos)	Secuencia
Péptido 2	11-22	FHIQGQVYCDTC
Péptido 3	22-33	CRAGFITELSEF
Péptido 10	91-102	NEIPTEGWAKPS
Péptido 11	109-120	TVNGTTRTVNPL
Péptido 12	119-130	PLGFFKKEALPK

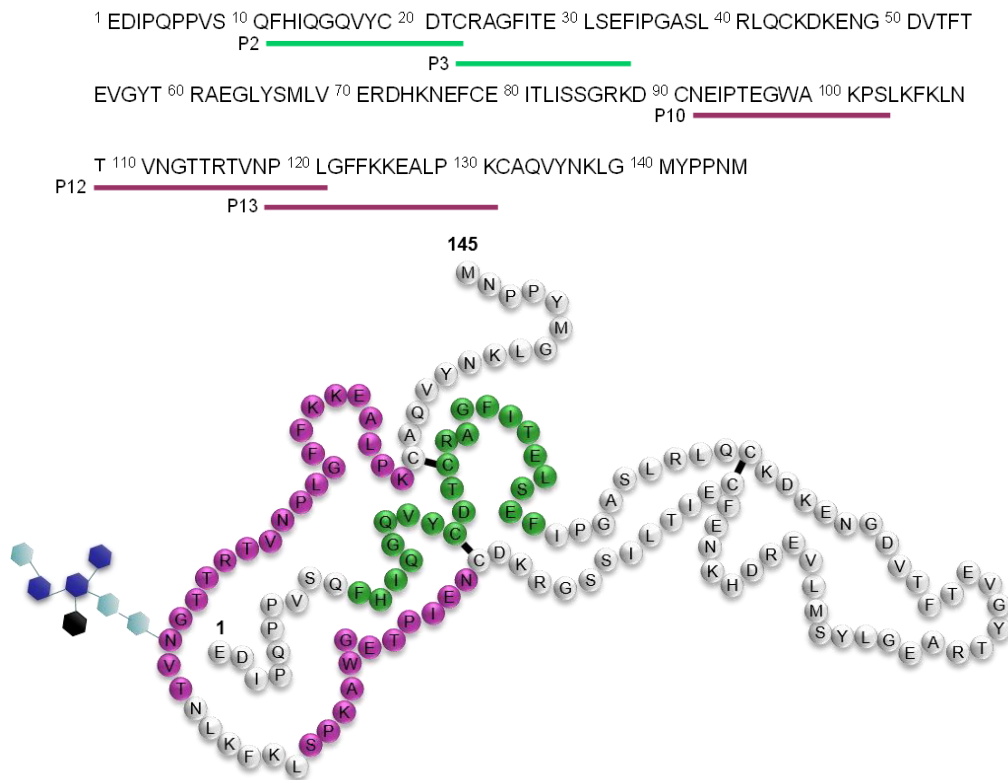


Figura 9. Secuencias de los péptidos derivados de Ole e 1. Las secuencias de color verde indican los Péptidos 2 y 3 (posibles epítomos inmunomoduladores), las de color morado, los Péptidos 10, 12 y 13 (los epítomos definidos como inmunodominantes). Figura adaptada de Villalba M, *et al.*, 2014.

El liofilizado de cada péptido se resuspendió en agua destilada a una concentración de 1 mg/ml. Para los ensayos celulares, se diluyeron los péptidos en medio RPMI-1640 (Lonza, Verviers, Bélgica) a una concentración de 200 µg/ml y se esterilizaron mediante filtración.

4.2 DESCONGELACIÓN DE LAS PBMC

Este proceso se realizó en condiciones estériles, en una cabina de flujo laminar (Cultek, Madrid, España). El primer paso consiste en la descongelación de las PBMC almacenadas en N₂ líquido. Según el protocolo, las células se resuspenden en 50 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Lonza, Verviers, Bélgica) con ayuda de una pipeta. Este proceso debe realizarse con rapidez para prevenir la formación de cristales (debido al cambio brusco de temperatura) y minimizar los efectos tóxicos de los crioprotectores que producirían daño y pérdida de viabilidad celular. La suspensión de células se centrifuga durante 10 minutos, a 675 g, en una centrífuga *Allegra X-15R* (Beckman Coulter). El precipitado celular se resuspende en medio de cultivo RPMI-1640 (Lonza) y se cuentan las células viables según el procedimiento descrito en el Apartado 2.2 de Materiales y Métodos. Se repite el proceso de lavado y las células se resuspenden en medio de cultivo completo, que se

prepara en fresco, añadiendo al medio de cultivo RPMI-1640 (Lonza), 1% penicilina-estreptomicina (Gibco, Carlsbad, California, Estados Unidos), 1% glutamina (Gibco), 10% suero de ternera fetal (Lonza) inactivada previamente (30 minutos a 56°C), 1% piruvato de sodio (Gibco), todo ello previamente filtrado, dejando las células a una concentración aproximada de 1.10^6 células/ml.

4.3 ENSAYOS CELULARES

Los ensayos de estimulación se realizaron en condiciones estériles. Para ello, se usaron placas de 24 pocillos (Costar, Nueva York, Estados Unidos), con una concentración aproximada de 1.10^6 células/ml por pocillo para cada una de las condiciones experimentales planteadas:

1. PBMC en ausencia de estímulos, condición Basal.
2. PBMC cultivadas con el extracto completo de polen de olivo (Olea) (25 µg/ml).
3. PBMC cultivadas con el Péptido 2+3 (P2+3, *pool* del Péptido 2 y del Péptido 3, descrito como la mezcla de volúmenes iguales con la misma concentración de cada uno de los péptidos) a una concentración final de 5 µg/ml.
4. PBMC cultivadas en presencia del Péptido 10+12+13 (P10+12+13, *pool* del Péptido 10, Péptido 12 y Péptido 13, descrito como la mezcla de volúmenes iguales con la misma concentración de cada uno de los péptidos) a una concentración final de 5 µg/ml.

Como control positivo se utilizó fitohematoglutinina (PHA) (2,5 µg/ml).

La elección de las concentraciones y las combinaciones de los estímulos para los cultivos de células se basaron en ensayos previamente publicados (Cárdaba B. *et al.*, 1998).

Las células se incubaron en una estufa a 37°C con el 5-10% de CO₂ durante 24 o 72 horas. Transcurrido ese tiempo, las células se traspasan a un tubo de 2 ml libre de ribonucleasas (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se centrifugan a 12.000 g durante 10 minutos en una microfuga Mikro 24-48 (Hettich AG, Tuttlingen, Alemania). El sobrenadante se guarda a -80°C para realizar los estudios de citocinas. Por otro lado, el sedimento celular se resuspende en 800 µl de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos) para extraer el RNA y/o proteínas.

- Los ensayos de 24 horas se utilizaron para el estudio de citocinas y de expresión génica, (sujetos de estudio n= 84).

- Los ensayos de 72 horas se utilizaron para el estudio de expresión de proteínas (sujetos de estudio n= 10)

5 MEDIDA DE LOS NIVELES DE CITOCINAS SOLUBLES EN EL SOBRENADANTE DE CULTIVO

Con el fin de analizar si los distintos estímulos son capaces de inducir la secreción de citocinas, se evaluaron los niveles de algunas de ellas en los sobrenadantes del cultivo celular. Para este estudio, se realizó una mezcla (*pool*) de volúmenes iguales de los sobrenadantes de dos o tres sujetos, para cada una de las condiciones planteadas y para cada periodo de exposición al alérgeno.

Las citocinas medidas en el estudio representan distintos tipos de respuesta celular: IL-2, citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), citocina Th1 (IFN- γ), citocinas Treg (IL-10 y TGF- β) y TNF- α , que se estudiaron mediante citometría de flujo, con el citómetro FACSCalibur (Beckton Dickinson, San José, CA, Estados Unidos), excepto el TGF- β que se determinó mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*) (R&D System, Minneapolis, Estados Unidos).

5.1 ESTUDIO DE CITOCINAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Para la determinación de los niveles de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ se usó el *BD Cytometric Bead Array (CBA), human Th1/Th2 Cytokine Kit* (Beckton Dickinson). Esta técnica combina el fundamento del inmunoanálisis con la citometría de flujo. Su principal ventaja es que permite estudiar de forma simultánea, los niveles de 6 proteínas en una misma muestra. Además, distintos estudios han demostrado que su sensibilidad analítica es comparable a la de los test de ELISA convencionales (Chen R. *et al.*, 1999). El kit permite detectar un rango de cada una de las citocinas de entre 2,4-5.000 pg/ml.

El principio de esta técnica, tal y como indica la Figura 10, reside en la existencia de 6 poblaciones diferentes de microesferas de poliestireno. Cada población está marcada con una intensidad de fluorescencia determinada y tienen, adheridas a su superficie, anticuerpos específicos para cada una de las seis citocinas a analizar (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TNF- α). Una vez que las microesferas se han unido a las citocinas presentes en la muestra, se incuban con anticuerpos de detección específicos de cada citocina, marcados con ficoeritrina (PE). Se forman así complejos tipo sándwich que se detectan mediante citometría de flujo.

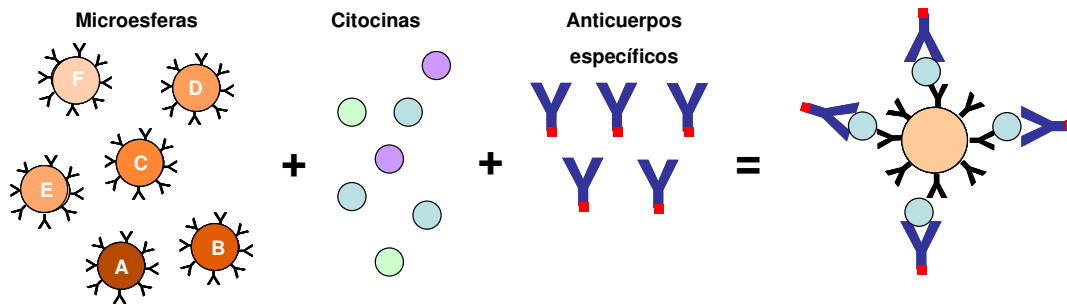


Figura 10. Principio de la técnica utilizada en la cuantificación de citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ . *BD Cytometric Bead Array (CBA) human Th1/Th2 Cytokine Kit* (Beckton Dickinson). Las microesferas están recubiertas de anticuerpos de captura que se unen específicamente a una citocina y esta, a su vez, se une a su anticuerpo de detección conjugado con un fluorocromo.

Seguendo las especificaciones del protocolo del *human Th1/Th2 Cytokine Kit*, en primer lugar, se reconstituyen los estándares (*human Th1/Th2 Cytokine Standards*) con 2 ml de diluyente (*Assay Diluent*). El tubo se agita y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. A partir de ese tubo, se hacen diluciones seriadas de las muestras estándares, que oscilan desde 0 pg/ml hasta 5.000 pg/ml para cada una de las citocinas. De manera análoga, se realizan varias diluciones de las muestras problema (en este caso de los sobrenadantes de cultivo) para cerciorarse de que los valores de fluorescencia se encuentren entre los límites detectables de la curva estándar. Una vez realizadas las muestras estándares, se prepara la mezcla de las microesferas de captura (cada población se presenta en envases individuales), teniendo en cuenta el número de tubos que se van a analizar en cada ensayo (estándares y muestras de los sobrenadantes). Por cada tubo, se mezclan 10 μ l de cada población de microesferas de captura [*Human Cytokine Capture Beads (A1-A6)*] y se agita con un agitador tipo *vortex*. A continuación, se mezclan 50 μ l de cada una de las muestras, con otros 50 μ l de la mezcla de las microesferas de captura y 50 μ l del anticuerpo de detección (*Human Th1/Th2 PE Detection Reagent*, reactivo suministrado en el kit), en el que se encuentran los anticuerpos específicos de cada citocina marcados con PE.

Las mezclas se incuban durante 3 horas a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Después, se lavan para eliminar el reactivo que no se ha unido a los complejos, con 1 ml del tampón de lavado proporcionado en el kit, y se centrifuga cada tubo a 200 g durante 5 minutos. Posteriormente, se elimina el sobrenadante, se resuspende el precipitado en 300 μ l del tampón de lavado y se procede a la adquisición de las muestras en el citómetro. En este caso, se usó un FACSCalibur (Beckton Dickinson) en el que se midió la fluorescencia de cada una de las muestras, adquiriéndose un mínimo de 2.000 eventos para cada citocina. Finalmente, se realizaron 6 curvas estándares (una para cada citocina) en las que se interpolaron los valores obtenidos en las muestras problema mediante el programa *BD CBA Analysis Software*.

Los niveles de la citocina IL-13 se midieron utilizando el *Human Soluble Protein Flex Set System* (Beckton Dickinson) mediante citometría de flujo. El principio del kit y el protocolo de actuación son similares al caso anterior aunque más sencillos, ya que solo se detectan los niveles de un analito y, por tanto, solo existe una población de microesferas de captura.

5.2 ESTUDIO DE TGF- β 1 MEDIANTE ELISA

Los niveles de TGF- β 1 medidos en el sobrenadante del cultivo se analizaron mediante el kit de ELISA *Quantikine Human TGF- β 1* de R&D Systems (rango de detección de 1,7-2.000 pg/ml).

El protocolo especificado requiere un paso previo de preparación de las muestras y reactivos. Para la preparación de las muestras, se realiza un paso de activación y neutralización en el que el TGF- β 1 presente en el sobrenadante pasa de una forma latente a una inmunorreactiva. Para ello, a cada 100 μ l de cada *pool* de sobrenadante se le añaden 20 μ l de HCl 1N. Las muestras acidificadas se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente, se neutralizan con 20 μ l de NaOH 1,2 N/0,5 M HEPES (Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazine-etanosulfónico). En cuanto a la preparación de los reactivos, el reactivo *Wash Buffer* (provisto en el kit) se diluye en agua destilada a una dilución 1:25 y el *Calibrator Diluent RD5-26 Concentrate* a una dilución 1:3 (también en agua destilada). Con este último se prepara la dilución madre de los estándares (*TGF- β 1 Standard*) de la que se harán diluciones seriadas. La solución del sustrato (*Substrate Solution*) se prepara mezclando volúmenes iguales de los reactivos A y B, 15 minutos antes de su uso.

Una vez preparados los reactivos, se realiza el ELISA, en el que cada muestra debe analizarse por duplicado. En primer lugar, se añaden a cada pocillo de la placa proporcionada en el kit (que tiene pegado el anticuerpo específico para el TGF- β 1) 50 μ l de *Assay Diluent RD1-21* y 50 μ l de cada estándar, control o muestra problema; se agita y se mantiene a temperatura ambiente durante dos horas. A continuación, se aspira con una pipeta el contenido de cada pocillo y se desecha. Se procede entonces al lavado de la placa (4 veces) añadiendo 400 μ l¹ del *Wash buffer* y desechando. Una vez lavada, se añaden 100 μ l¹ del *TGF- β 1 Conjugate* que se incuba durante dos horas a temperatura ambiente. De nuevo, la placa se lava cuatro veces, se añaden 100 μ l¹ del reactivo *Substrate Solution* previamente preparado y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se añaden 100 μ l¹ del reactivo que paraliza la reacción (*Stop solution*) y se miden los niveles de absorbancia a 450 nm con un filtro de referencia a 540 nm

¹ μ l por pocillo.

o a 570 nm. Para ello, se usó el espectrofotómetro de placas *Infinite F200* (Tecan, Männedorf, Suiza). Para calcular los niveles de TGF- β 1, se realiza una recta patrón a partir de las absorbancias medidas para cada estándar y se interpola la absorbancia obtenida para las muestras problema. Por último, se deshace el factor de dilución.

6 EXTRACCIÓN DEL RNA

El proceso de extracción de RNA se realiza en un entorno libre de ribonucleasas, siguiendo el protocolo de Trizol (Invitrogen). El sedimento celular (1.10^6 PBMC) se resuspende en 800 μ l de Trizol (Invitrogen) en un tubo Eppendorf de 2 ml (Hamburgo, Alemania), y se agita en un agitador tipo *vortex* durante 5 minutos a temperatura ambiente, para conseguir la liberación de los ácidos nucleicos. A continuación, se añaden 160 μ l de cloroformo (Sigma-Aldrich), se agita y se mantiene a temperatura ambiente durante 3 minutos para posteriormente, centrifugar a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C, en una microfuga Mikro 24-48 (Hettich AG). Tras la centrifugación observamos tres fases claramente diferenciadas:

- Fase superior: fase acuosa, donde se localiza el RNA
- Interfase: DNA.
- Fase inferior: fenol/cloroformo (fase proteica).

La fase superior/fase acuosa se recoge sin aspirar el anillo intermedio ni la fase inferior y se transfiere a un nuevo tubo Eppendorf de 2 ml, al que se añaden 400 μ l de isopropanol para precipitar el RNA. Las muestras se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación, se centrifugan a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, el sobrenadante se decanta y se lava el sedimento del RNA con 800 μ l de etanol al 75%, mediante centrifugación a 7.500 g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se elimina cuidadosamente para no aspirar el sedimento de RNA y se deja secar durante 10 minutos. Por último, se resuspende el sedimento en 25 μ l de agua libre de ribonucleasas (*Experion DEPC-Treated Water*, Bio-Rad, Hércules, California, Estados Unidos) y se procede a determinar la integridad y a cuantificar la cantidad del RNA extraído.

6.1 MEDIDA DE LA INTEGRIDAD DEL RNA

La integridad de las muestras de RNA se determinó en un Bioanalizador 2.100 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, Estados Unidos). Esta tecnología se basa en los patrones de movilidad electroforética de muestras de RNA en una matriz de gel introducida en pequeños chips.


Antes de proceder a la preparación del chip, se realiza la limpieza de los electrodos del bioanalizador (para evitar contaminaciones y la degradación de las muestras). Para ello, el kit incluye dos chips de limpieza. En primer lugar, se carga uno con 350 μl de solución limpiadora *RNaseZap* (Invitrogen) y se mantiene durante 1 minuto en el bioanalizador. Posteriormente, se coloca el otro chip de limpieza con 350 μl de agua libre de ribonucleasas durante 10 segundos. Este proceso debe repetirse al finalizar el protocolo.

En nuestro caso, se utilizó un kit específico para muestras de RNA (*RNA 6.000 Nano de Agilent Technologies kit*) siguiendo las recomendaciones del protocolo de la casa comercial.

En primer lugar, se prepara la matriz del gel. Para ello, se filtran 550 μl del producto *Agilent RNA 6.000 Nano gel matrix* en una columna con filtro, centrifugando a 1.500 g durante 10 minutos. Posteriormente, se recogen 65 μl de este filtrado en un nuevo tubo y se añade 1 μl del colorante *RNA 6.000 Nano dye concentrate*. La mezcla se homogeneiza en un agitador tipo *vortex*, se centrifuga a 13.000 g durante 10 minutos y se mantiene en oscuridad. A continuación, se procede a la desnaturalización de 1 μl del marcador de peso molecular (*RNA 6.000 ladder*) y de las muestras de RNA que se quieren analizar. Para ello, se incuban a 70°C durante 2 minutos. Una vez desnaturalizadas, se mantienen en hielo.

El chip se coloca en una plataforma especial para su montaje (suministrada junto al aparato). Se pipetea 9 μl de la mezcla gel/colorante (*Agilent RNA 6.000 Nano gel matrix/RNA 6.000 Nano dye concentrate*) en el pocillo del chip marcado como **G** (Figura 11) y se presiona con ayuda de una jeringa (incluida en el kit) durante 30 segundos. También se aplican 9 μl de la mezcla gel/colorante en los otros dos pocillos marcados como **G** (Figura 11). Posteriormente, se cargan 5 μl del marcador *RNA 6.000 Nano Marker* y 1 μl de muestra de RNA en el resto de los pocillos del chip. Si no tenemos suficientes muestras para llenar un chip, se añade 1 μl de agua desionizada en los pocillos no ocupados. Por último, se aplica 1 μl del marcador de peso molecular (*RNA 6.000 ladder*) en el pocillo marcado con el símbolo de marcador **100** (Figura 11).



Figura 11. RNA Nano-chip. Modelo de chip utilizado en el bioanalizador, donde se muestran los 16 pocillos para cargar las muestras de RNA, los pocillos con la mezcla gel/colorante G, G y el pocillo del marcador .

Una vez finalizado el proceso de preparación, el chip se agita en un agitador IKA (Agilent Technologies) durante 1 minuto a 2.400 rpm. Posteriormente, se coloca en el Bioanalizador 2.100 (Agilent Technologies) para proceder a la lectura de las muestras mediante el *Agilent 2.100 Biosizing Software*, que analiza los datos obtenidos. El programa informa de la concentración de RNA de cada muestra y de la calidad e integridad de la misma, en base al número RIN (*RNA Integrity Number*). Este valor se da en una escala del 1 al 10, siendo 10 el RNA completamente intacto. Un valor de RIN superior a 7,5 se considera aceptable para conseguir resultados fiables en posteriores experimentos. Todas las muestras de RNA analizadas en este estudio cumplían esta condición.

6.2 CUANTIFICACIÓN DEL RNA

La concentración de las muestras de RNA se midió en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1.000 (Biosai Technologies Group, Madrid, España) siguiendo el protocolo de la casa comercial. El programa informático utilizado fue el Nanodrop 3.0.1.

En primer lugar, se coloca una gota de 2 μ l de agua libre de ribonucleasas en el pedestal del lector para realizar la limpieza de la microcubeta. Posteriormente, se selecciona el programa de ácidos nucleicos y el tipo de medida a realizar (RNA). Se seca el pedestal y se coloca otra gota de 2 μ l de agua libre de ribonucleasas para realizar la medida del blanco. Se vuelve a secar el pedestal, se colocan 2 μ l de la muestra de ácido nucleico a cuantificar y se realiza la medida. El programa informa sobre la concentración de RNA de la muestra (expresado en ng/ μ l) en base a la absorbancia registrada a 260 nm (longitud de onda absorbida por los ácidos nucleicos), así como el estado de pureza en el que se encuentra, por medio del ratio 260 nm/280 nm y 260 nm/230 nm. La presencia de picos a 280 nm indica presencia de contaminación proteica o fenol, lo cual afecta al ratio 260/280. El ratio considerado óptimo es 1,70-2,00. Otros contaminantes, como Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), carbohidratos o fenoles, absorben a 230 nm y por ello el ratio

260 nm/230 nm es también importante, considerándose que el rango óptimo debe estar entre 2,00-2,20. Todas las muestras de RNA utilizadas en este estudio cumplieron estas condiciones.

7 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MASIVA MEDIANTE MICROARRAYS

Los *microarrays* de expresión génica permiten analizar el perfil de expresión génica de todos los genes humanos conocidos, en muestras de distinta procedencia. Son nanodispositivos de plástico o cristal en los que se depositan distintos tipos de sondas. En este caso, seleccionamos como sondas oligonucleótidos de longitud variable (25-70 pares de bases) que representan los diferentes genes existentes en el ser humano, y que van a hibridar específicamente con el DNA complementario (cDNA) de cada gen de la muestra a analizar. El revelado posterior muestra qué grado de hibridación presenta cada gen y, de este modo, se determina su nivel de expresión.

7.1 SELECCIÓN DE SUJETOS DE ESTUDIO

Para este estudio se seleccionaron de la población inicial 27 sujetos, 6 de cada uno de los 5 grupos clínicos de estudio, a excepción del grupo de asintomáticos (en este grupo solo se estudiaron 3 individuos).

7.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE RNA

El RNA total de estos sujetos se aisló de las PBMC (1.10^6 células) previamente cultivadas, según se ha descrito en el Apartado 4.3. La extracción del RNA se realizó siguiendo el método de Trizol (Invitrogen) como se indica en el Apartado 6. El RNA se cuantificó por espectrofotometría según se describe en el Apartado 6.2 y su integridad se confirmó con un bioanalizador de Agilent (Agilent Technologies) siguiendo el protocolo del Apartado 6.1.

Los estudios de *microarrays* se realizaron a partir de mezclas equimolares de dos RNA (ratio 1:1) de sujetos del mismo grupo de estudio, en el mismo periodo de exposición al alérgeno y bajo las mismas condiciones de estimulación (ausencia/presencia de estímulo). Esta estrategia aporta beneficios ya demostrados en estudios anteriores (Kendzioriski C.M. *et al.*, 2005), puesto que permite maximizar el número de individuos que participan en el estudio, incrementar la potencia estadística y la representación de variabilidad intraindividuo. Por ello, se crearon 3 *pools* independientes para cada grupo clínico de estudio (sujetos no alérgicos, pacientes alérgicos no sensibilizados al polen de olivo, pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento y pacientes

alérgicos al polen de olivo con tratamiento específico) a excepción del grupo de asintomáticos en los que no se realizó la estrategia de mezclas equimolares (*pools*). Los sujetos que participaron en los *pools* aparecen indicados en la Tabla 4.

Tabla 4. Caracterización de los *pools* utilizados en los análisis de expresión génica por *microarrays*.

Grupo	Nº <i>pool</i> / muestras RNA	Sujeto 1	Sujeto 2
G1: No alérgicos	1	S1.4	S1.5
	2	S1.7	G1.2
	3	S1.1	J1.2
G2: Asintomáticos	1	S2.1	-
	2	S2.5	-
	3	S2.9	-
G3: Alérgicos no sensibilizados al polen de olivo	1	J3.3	J3.5
	2	J3.4	J3.9
	3	G3.4	G3.3
G4: Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento	1	S4.5	G4.4
	2	J4.5	J4.8
	3	J4.1	J4.6
G5: Alérgicos al polen de olivo tratados AIT	1	G5.2	M5.2
	2	J5.1	S5.4
	3	J5.5	G5.5

La Tabla indica la procedencia de cada muestra y la composición individual de cada *pool*. Estos *pools* se repiten para cada condición experimental (ausencia/presencia de estímulos) en los dos periodos de exposición al alérgeno.

El número total de muestras analizadas en el estudio de expresión masiva aparece desglosado en la Tabla 5. En total se realizó el estudio de 120 dispositivos de *microarrays*, uno por cada una de las muestras de RNA a analizar.

Tabla 5. Número total de muestras de RNA utilizadas en los *microarrays*.

Grupo clínico	Nº de sujetos	Periodo de exposición (durante y fuera de la polinización)	Condiciones experimentales	Muestras de RNA totales	Muestras / <i>pools</i> de RNA analizados
G1: No alérgicos	6	2	4	48	24 <i>pools</i>
G2: Asintomáticos	3	2	4	24	24 muestras
G3: Alérgicos no sensibilizados al polen de olivo	6	2	4	48	24 <i>pools</i>
G4: Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento	6	2	4	48	24 <i>pools</i>
G5: Alérgicos al polen de olivo tratados con AIT	6	2	4	48	24 <i>pools</i>
TOTAL				216	120

7.3 MICROARRAYS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE AFFYMETRIX

Para realizar el análisis de la expresión génica de las muestras, se utilizó el chip de oligonucleótidos *HuGe U133 plus 2.0 GeneChip* de Affymetrix (Santa Clara, CA, Estados Unidos), que permite el estudio de 46.010 transcritos y variantes del genoma humano.

Las sondas de este dispositivo están diseñadas a partir de las bases de datos públicas GeneBank, dbEST y RefSeq. Para su correcta identificación, están nombradas con un número y diferentes tipos de sufijos que describen su capacidad para unirse a diferentes genes o variantes:

- Sufijo "_at" significa que la sonda hibrida con un único transcrito.
- Sufijo "_a_at" significa que la sonda reconoce transcritos múltiples del mismo gen.
- Sufijo "_s_at" significa que la sonda reconoce múltiples transcritos de genes diferentes. El 90% de estas sondas representan variaciones de *splicing*.
- Sufijo "_x_at" significa que no ha sido posible seleccionar una única sonda o conjunto de sondas para los diferentes transcritos múltiples. Estas sondas hibridan de manera impredecible, ya que comparten secuencias idénticas para las variantes.

Por cada sonda del chip (secuencia deseada o *Perfect Match*, PM), se coloca otra igual con una ligera modificación en la decimotercera base del oligonucleótido (secuencia cambiada o *Mismatch*, MM) que se utiliza para medir la hibridación inespecífica. El conjunto de PM y MM se llama *Probe set* (Maresso, K., Broeckel, U., 2008).

El protocolo seguido para este análisis es el aconsejado por la casa comercial, tal y como se detalla en la Figura 12. Los procesos de transcripción, hibridación y escaneado de los *microarrays* se realizaron en el Parque Científico de la Universidad Complutense de Madrid.

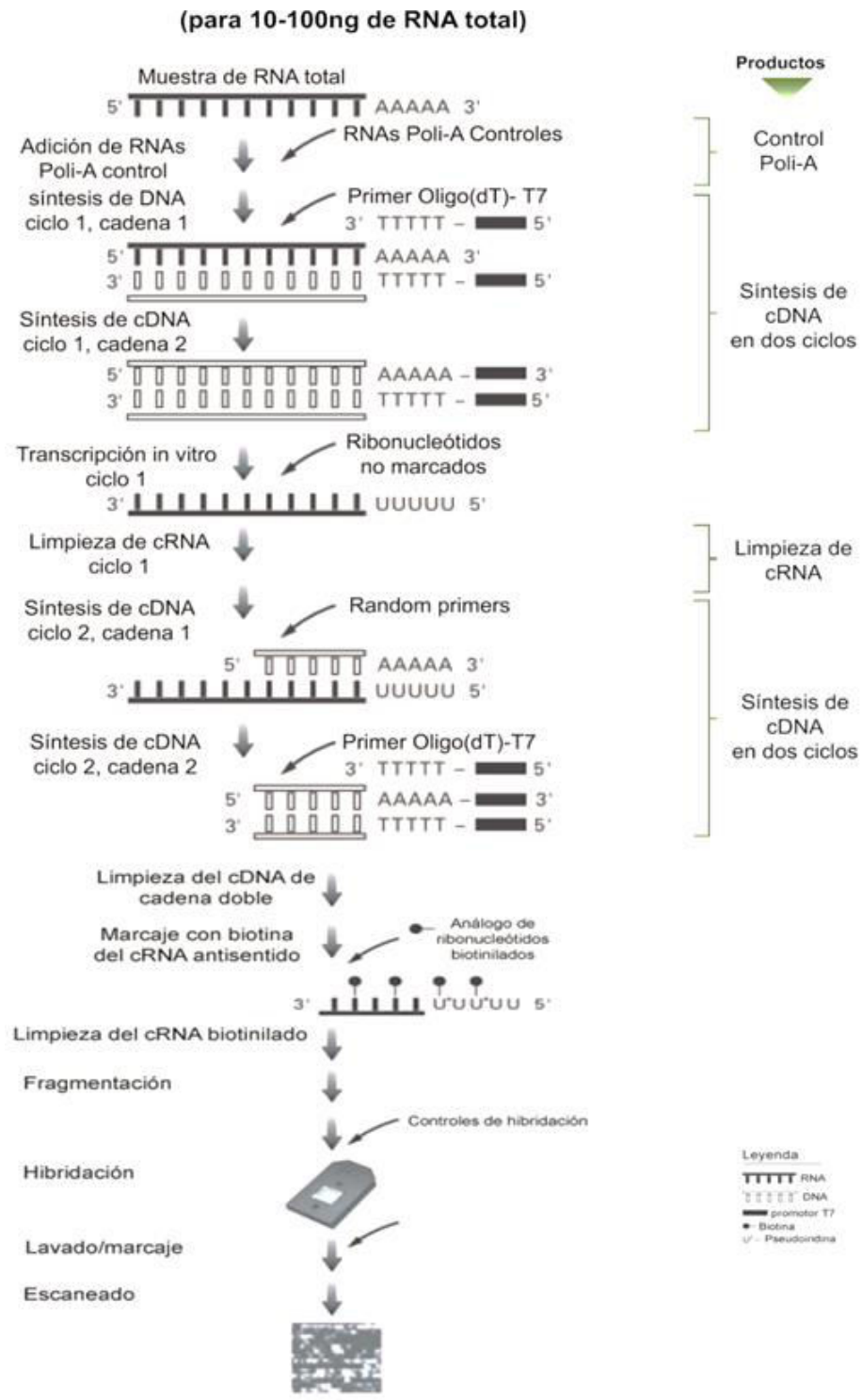


Figura 12. Protocolo de *HuGe U 133 plus 2.0 GeneChip* de Affymetrix.

7.3.1 Protocolo de transcripción

La transcripción consiste en la transformación de RNA a cRNA mediante una ronda doble de transcripción *in vitro*. En nuestro caso partimos de 80 ng de RNA por *pool*/muestra. Para las incubaciones necesarias en este protocolo, se utilizó un termociclador ABI 9.700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos).

7.3.1.1 Preparación de las muestras y controles

En primer lugar, se preparan los controles de RNA Poli-A y el *buffer* en el que van diluidos (ambos incluidos en el *Poly-A RNA Control kit* de Affymetrix). Para 80 ng de RNA de partida, se necesita una dilución 1:80.000 del *Poli-A Control Stock* diluido en el *Poli-A Control Diluent Buffer* hasta un volumen total de 100 μ l. A continuación, estos controles se utilizan para preparar una mezcla con cebadores oligo(dT)-T7. Las cantidades reflejadas en la Tabla 6 son suficientes para 10 muestras.

Tabla 6. Mezcla del *buffer* Poli-A/oligo (dT)-T7.

Reactivo	Volumen (μ l)
Cebadores oligo(dT)-T7 (50 μ M)	2
Controles Poli-A diluidos	2
Agua libre de ribonucleasas	16

Una vez preparado el *buffer* Poli-A RNA/oligo (dT)-T7 se mezcla con la muestra de RNA de estudio (Tabla 7). La mezcla se incuba a 70°C durante 6 minutos y posteriormente, a 4°C durante 2 minutos.

Tabla 7. Mezcla de reacción del RNA/Buffer Poli-A/oligo (dT)-T7.

Reactivo	Volumen (μ l)
Muestra de RNA	10-100 ng
<i>Buffer</i> Poli-A RNA/oligo (dT)-T7	2 μ l
Agua libre de ribonucleasas	completar volumen hasta 5 μ l

7.3.1.2 Síntesis de la doble cadena de cDNA del primer ciclo

Esta síntesis se produce en dos pasos: en una primera ronda se sintetiza la primera cadena del cDNA y en una segunda ronda de amplificación se hace bicatenario.

7.3.1.2.1 Síntesis de la primera cadena de cDNA del primer ciclo

En primer lugar, se prepara la mezcla de reacción indicada en la Tabla 8, cuyos componentes vienen incluidos en el kit *Two-cycle cDNA Synthesis* (Affymetrix) (cantidades por muestra).

Tabla 8. Mezcla de reacción para la síntesis de la primera cadena de cDNA del primer ciclo.

Reactivo	Volumen (μl)
5X 1st Strand Reaction Mix	2
DTT 0,1 M	1
Inhibidor de ribonucleasas	0,5
dNTPs 10 mM	0,5
Enzima <i>SuperScript</i> II	1

Esta mezcla se transfiere a las muestras de RNA que ya llevan la mezcla Poli-A/oligo (dT)-T7. La mezcla resultante (10 μl) se incuba durante 1 hora a 42°C para que se lleve a cabo la reacción. Posteriormente, se aumenta la temperatura hasta 70°C durante 10 minutos y se enfría, al menos 2 minutos a 4°C, para inactivar la enzima retrotranscriptasa.

7.3.1.2.2 Síntesis de la segunda cadena de cDNA del primer ciclo

Con los componentes del kit *Two-Cycle cDNA Synthesis* (Affymetrix) se prepara la mezcla de reacción indicada en la Tabla 9 (por cada muestra).

Tabla 9. Mezcla de reacción para la síntesis de la segunda cadena de cDNA del primer ciclo.

Reactivo	Volumen (μl)
Agua libre de ribonucleasas	4,8
MgCl ₂ 17,5 mM (recién preparado a partir de la solución 1mM)	4
dNTP, 10 mM	0,4
<i>E.coli</i> DNA polimerasa I	0,6
Rnasa H	0,2

Esta mezcla se añade a la mezcla de reacción del paso anterior para formar 20 μl totales, que se incuban en las condiciones óptimas de actuación de la enzima: 2 horas a 16°C, 10 minutos a 75°C y se enfría a 4°C.

7.3.1.3 Síntesis y purificación del cRNA

Una vez obtenido el cDNA, se realiza la transcripción *in vitro* para la síntesis del cRNA. Para ello se prepara la mezcla de reacción IVT (*In Vitro Transcription Technology*) como se indica en la Tabla 10 (cantidades por muestra), a partir de los reactivos suministrados en el kit *MEGAscript High Yield Transcription* (Ambion, Foster City, CA, Estados Unidos).

Tabla 10. Mezcla de reacción *In Vitro Transcription Technology*.

Reactivo	Cantidad (µl)
10X <i>Buffer</i> de reacción	5
ATP	5
CTP	5
UTP	5
GTP	5
Mezcla de la enzima <i>MEGAscript T7</i>	5

La mezcla de reacción IVT se transfiere a la mezcla obtenida en el paso anterior (cDNA). Esta nueva mezcla (50 µl) se incuba a 37°C durante 16 horas. En este punto la muestra se puede purificar o guardar a -20°C.

Para la limpieza del cRNA se utilizó el kit *GeneChip Sample Cleanup Module* (Affymetrix) que incorpora diferentes tampones de lavado. En primer lugar, se añaden 50 µl de agua libre de ribonucleasas y 350 µl de *IVT cRNA Binding Buffer* a la reacción IVT obtenida del paso anterior. Se agita mediante pipeteo y se añaden 250 µl de etanol (96-100%). El volumen total de la muestra (700 µl) se carga en la columna *IVT cRNA Cleanup Spin Column*, dentro de un tubo de 2 ml, se centrifuga durante 15 segundos a 8.000 g y se desecha el sobrenadante. La columna se transfiere a un nuevo tubo de 2 ml, donde se añaden 500 µl de *IVT cRNA Wash Buffer* y se centrifuga 15 segundos a 8.000 g para eliminar el sobrenadante. En un siguiente paso de lavado, se añaden 500 µl de etanol 80% (v/v) a la columna, se vuelve a centrifugar 15 segundos a 8.000 g y se desecha el sobrenadante. Para secar la membrana de la columna, se centrifuga durante 5 minutos a máxima velocidad (25.000 g), se elimina el sobrenadante y el tubo de 2 ml. El último paso consiste en la elución del cRNA obtenido. Para ello la columna se coloca en un tubo de 1,5 ml y se pipetea 13 µl de agua libre de ribonucleasas directamente en la membrana de la columna. Se mantiene a temperatura ambiente durante 4 minutos y se centrifuga 1 minuto a máxima velocidad (25.000 g). El cRNA se cuantifica en un Nanodrop (Apartado 6.2).

7.3.1.4 Síntesis de la doble cadena de cDNA del segundo ciclo

7.3.1.4.1 Síntesis de la primera cadena de cDNA del segundo ciclo

En el segundo ciclo, se vuelve a sintetizar la primera cadena de cDNA a partir del material que se ha obtenido en el ciclo anterior. Para ello se utiliza el kit *Two-Cycle cDNA Synthesis* (Affymetrix). Primero, se realiza una disolución fresca de cebadores al azar (*random*) a una concentración final de 0,2 µg/µl. Se añaden 2 µl de esta disolución al cRNA purificado anteriormente, junto con agua libre

de ribonucleasas, hasta un volumen de 11 μl . Se deja incubar 10 minutos a 70°C y se enfría a 4°C, durante al menos dos minutos.

En un tubo aparte, se prepara la mezcla de reacción con los componentes indicados en la Tabla 11 (por muestra).

Tabla 11. Mezcla de reacción para la síntesis de la primera cadena de cDNA del segundo ciclo.

Reactivo	Volumen (μl)
5X <i>First Strand Reaction Mix</i>	4
DTT 0,1 M	2
Inhibidor de RNAsas	1
dNTPs 10mM	1
<i>SuperScript II</i>	1

Se añaden 9 μl de esta mezcla de reacción a cada muestra con los cebadores *random* hasta un volumen final de 20 μl . Se incuban a 42°C durante 1 hora y se enfrían a 4°C, se añade 1 μl de RNasa H a cada muestra y se incuba durante 20 minutos a 37°C, 5 minutos a 95°C durante 5 minutos y se guarda en frío.

7.3.1.4.2 Síntesis de la segunda cadena de cDNA del segundo ciclo

Para sintetizar la segunda cadena de cDNA del segundo ciclo, se preparan cebadores Oligo(dT)-T7 diluidos a una concentración final de 5 μM . Se añaden 4 μl de cebadores a la muestra obtenida del paso anterior para tener un volumen final de 25 μl y se incuba 6 minutos a 70°C, para posteriormente llevarlo a 4°C. A continuación, se prepara una mezcla de 125 μl (por muestra) con los reactivos necesarios (Tabla 12) para realizar la síntesis de la segunda cadena de cDNA del segundo ciclo. Esta mezcla se añade a cada muestra, obteniendo un volumen total de 150 μl , que se incuba durante 2 horas a 16°C. Se añaden 2 μl de DNA polimerasa T4 para después incubar durante 10 minutos a 16°C, tras lo cual, se mantiene a 4°C durante 2 minutos.

Tabla 12. Mezcla de reacción para la síntesis de la segunda cadena de cDNA del segundo ciclo.

Reactivo	Volumen (μl)
Agua libre de ribonucleasas	88
5X <i>Second Strand Reaction Mix</i>	30
dNTPs 10 mM	3
DNA polimerasa I de <i>E. coli</i>	4

7.3.1.4.3 Limpieza del cDNA de doble cadena

Para limpiar el cDNA de doble cadena se añaden 600 μl de cDNA *Binding Buffer* al cDNA obtenido, asegurándose que el color de la disolución es amarillo. Si el color vira a naranja o violeta, se debe añadir 10 μl de acetato de sodio 3M, pH 5.0. A continuación, se añaden 500 μl de esta mezcla en una columna cDNA *Cleanup Spin Column* suministrada en el kit *Sample Cleanup Module* (Affymetrix) que se coloca dentro de un tubo de 2 ml y se centrifuga durante 1 minuto a 8.000 g, se elimina el sobrenadante y se carga la columna con la disolución sobrante para centrifugarla de nuevo. En el siguiente paso, se transfiere la columna a un nuevo tubo de 2 ml y se lava añadiendo 750 μl del *cDNA Wash Buffer* en la columna, se centrifuga 1 minuto a 8.000 g y se elimina el sobrenadante.

La membrana de la columna se seca, centrifugándola durante 5 minutos a máxima velocidad (25.000 g). Se transfiere la columna a un nuevo tubo de 1,5 ml y se eluye el cDNA con 14 μl de *cDNA Elution Buffer*. Finalmente, se incuba a temperatura ambiente durante 4 minutos y se centrifuga 1 minuto a máxima velocidad (25.000 g). De media, se obtienen unos 12 μl por cada 14 μl de *Elution Buffer*.

En este punto, no se recomienda la cuantificación del cDNA, ni mediante gel, ni por espectrofotometría, debido a la presencia de varias especies de ácidos nucleicos que podrían interferir con los resultados.

7.3.1.5 Síntesis y limpieza del cRNA marcado con biotina

Para la síntesis del cRNA marcado con biotina, se transfieren 12 μl de cDNA a la mezcla IVT cuya composición se detalla en la Tabla 13.

Tabla 13. Mezcla de reacción para la síntesis de cRNA marcado con biotina.

Reactivo	Volumen (μl)
10X IVT Labeling buffer	4
IVT Labeling NTP Mix	12
IVT Labeling Enzyme Mix	4
Agua libre de ribonucleasas	completar hasta 40 μl

Estos componentes se mezclan y se incuban a 37°C durante 16 horas. El cRNA se limpia añadiendo 60 µl de agua libre de ribonucleasas al cRNA marcado y 350 µl de *IVT cRNA Binding Buffer*. Posteriormente, se añaden 250 µl de etanol (96-100%), se mezcla por pipeteo y se cargan 700 µl de la mezcla en una columna *IVT cRNA Cleanup Spin Column* colocada dentro de un tubo de 2 ml. Se centrifuga 15 segundos a 8.000 g y se desecha el sobrenadante. Se coloca la columna en un nuevo tubo de 2 ml, se lava añadiendo 500 µl de *IVT cRNA Wash Buffer* y se centrifuga 15 segundos a 8.000 g, para luego eliminar el sobrenadante. Posteriormente, se añaden 500 µl de etanol al 80% (v/v) en la columna y se centrifuga durante 15 segundos a 8.000 g, desechando el sobrenadante. Finalmente se elimina la tapa de la columna y se centrifuga 5 minutos a máxima velocidad (25.000 g), desechando el sobrenadante y el tubo.

La columna se coloca en un nuevo tubo de 1,5 ml y se añaden 11 µl de agua libre de ribonucleasas directamente en la membrana de la columna para eluir la muestra, tras centrifugar 1 minuto a máxima velocidad (25.000 g). Este proceso se repite 2 veces.

El cRNA puede ser ahora cuantificado mediante un nanodrop (Apartado 6.2) o un bioanalizador (Apartado 6.1). El cRNA se guarda a -70°C.

7.3.2 Hibridación

La reacción de hibridación se realizó mediante el *GeneChip Eukaryotic Hybridization Control kit* (Affymetrix), mezclando los componentes de la Tabla 14, siguiendo el protocolo de la casa comercial.

Tabla 14. Mezcla de reacción de hibridación.

Reactivo	Cantidad (µg)/Volumen (µl)
cRNA	10 µg
Controles de oligonucleótidos B2 (3nM)	3,3 µl
Controles de hibridación (<i>bioB</i> , <i>bioC</i> , <i>bioD</i> , <i>cre</i>) 20X	10 µl
DNA de esperma de arenque 10 mg/ml (Promega, Fitchburg, Winsconsin, Estados Unidos)	2 µl
BSA 50 mg/ml	2 µl
<i>Buffer</i> de hibridación 2X	100 µl
DMSO	20
Agua libre de ribonucleasas	Hasta 200 µl

Para asegurar el correcto proceso de marcaje, se usan como controles positivos grupos de RNA poliadenilado. Estos RNA proceden de genes (*lys*, *phe*, *thr* y *dap*) de *B. subtilis* que no están presentes en las muestras eucariotas. Estos controles se amplifican y marcan junto a las muestras.

Examinando la intensidad de hibridación de estos controles podemos observar cómo ha ocurrido el proceso de marcaje, independientemente de la calidad de las muestras de RNA.

El protocolo de hibridación consiste en calentar la mezcla a 99°C durante 5 minutos para posteriormente incubarla a 45°C durante 5 minutos. Mientras tanto, se humedece el canal de pruebas del chip con 200 µl del *Hibridization Buffer* 1X y se incuba durante 10 minutos a 45°C (con rotación). Se cargan los canales con 200 µl de la mezcla que contiene el cRNA y se incuba el *microarray* en un horno de hibridación *GeneChip Hybridization Oven 640* (Affymetrix) a 45°C, a 60 rpm, durante 16 horas. Después de este tiempo, se elimina la mezcla de hibridación y el chip se lava con 250 µl de Buffer A de lavado (compuesto de SSPE 6X, 0,01% Tween-20 y agua destilada) (SSPE: NaCl 3M, 0,2M NaH₂PO₄ y 0,02M de EDTA). Para marcar el *microarray*, se utilizó el protocolo de la casa comercial. Los reactivos utilizados se detallan en las Tablas 15 y 16.

Tabla 15. Solución de marcaje (SAPE).

Reactivo	Volumen (µl)
2X Buffer de tinción	600
50 mg/ml BSA	48
1 mg/ml de SAPE (Estreptavidina Ficoeritrina) (Applied Biosystems)	12
Agua libre de ribonucleasas	540
El volumen final (1200 µl) se divide en dos alícuotas	

Tabla 16. Solución de anticuerpos.

Reactivo	Volumen (µl)
2X Buffer de tinción	300
50 mg/ml BSA	24
10 mg/ml de anticuerpos IgG sintetizados en cabra	6
0,5 mg/ml anticuerpo biotinilado	3,6
Agua libre de ribonucleasas	266,4

La tinción y lavado del *microarray* se hicieron en la estación de fluidos *Fluidics Station 450*, seleccionando el protocolo EukGE-WS2v5_450. En los viales correspondientes, se cargan 600 µl de solución SAPE (vial 1), 600 µl de anticuerpo antiestreptavidina biotinilado (vial 2) y otros 600 µl de solución SAPE (vial 3). Se colocan las agujas dentro de los viales y se inicia el proceso, anteriormente mencionado, de manera automática. Tras este proceso, el chip está listo para ser escaneado.

7.3.3 Escaneado del *microarray*

Los chips se escanearon en el *Affymetrix GeneChip Scanner 3.000* (Affymetrix) que genera archivos ".dat". Esta información se procesa mediante el *Affymetrix GeneChip Operating Software* (GCOS) que calcula los datos de intensidad para cada sonda, generando los archivos ".cel" (*Cell Intensity File*) mediante el algoritmo *Microarray Suite 5.0* (MAS5.0).

7.3.4 Corrección y normalización de los datos

Los resultados de expresión obtenidos en los archivos ".cel" incluyen variaciones introducidas durante la preparación de muestra, manipulación del *microarray* y su procesamiento (marcaje, hibridación y escaneado) que pueden interferir con las variaciones biológicamente relevantes (Hartemink A.J. *et al.*, 2001). Por ello, es necesario procesar, corregir y normalizar los datos obtenidos.

El *background* de las señales de cada sonda se corrigió usando la metodología RMA (*Robust Multiarray Averaging*). Este método, que se utiliza para la medición de la expresión génica a nivel de *probeset* (pares de oligonucleótidos que representan cada gen), se basa en la medición de $\log_2 [B(PM)]$, donde B(PM) son las intensidades de los PM (*Perfect Match*) corregidas frente al fondo MM (*Mismatch*) (Irizarry R.A. *et al.*, 2003).

La intensidad de la señal se normalizó usando el algoritmo de normalización por cuartiles (Boltstad B.M. *et al.*, 2003). Esta normalización intenta que la distribución de las intensidades de las sondas sea la misma para todos los *microarrays*. Para ello se usó el programa *Partek Genomics Suite*.

7.3.5 Análisis de Componentes Principales (PCA)

Esta herramienta permite reducir la multidimensionalidad de los datos obtenidos por *microarrays* manteniendo las características que más contribuyen a su varianza, lo que facilita el análisis y la visualización de los datos. Matemáticamente, el PCA transforma los datos a un sistema de coordenadas en el que la mayor varianza de la proyección de los datos se representan en la primera coordenada (primer componente principal) y la segunda mayor varianza en la segunda coordenada (segundo componente principal). Este análisis se realizó mediante el programa *Partek Genomics Suite*.

7.3.6 Análisis estadístico de las diferencias de expresión génica

Para determinar las diferencias de expresión de cada sonda entre las diferentes muestras comparadas, se calculó el valor del *Fold Change* (definido como la relación entre las medias de expresión génica de dos condiciones experimentales) y se usó el test estadístico t-limma moderadas, obteniéndose un valor del estadístico t y su correspondiente p-valor (*raw p values*). Para la interpretación de los resultados se considera que un *Fold Change* de 1 o -1 es un no cambio en la expresión de la sonda (entre las dos condiciones/muestras comparadas) mientras que un *Fold Change* de 2 corresponde a duplicar la expresión de la sonda y un valor de -2 indica un descenso de expresión a la mitad.

Por convenio se considera, para cada sonda y para cada comparación, que las diferencias de expresión son estadísticamente significativas si el *Fold Change* es superior o igual a 2 o inferior o igual a -2 y el p-valor es $\leq 0,05$.

Debido a la complejidad del estudio estadístico, contamos con la colaboración de los expertos Dr. Manuel Mata (Adjunto de Investigación del Área de Medicina Molecular del Hospital General Universitario de Valencia), Dr. David Montaner y D. Joaquín Dopazo, especialistas en *microarrays* del Departamento de Bioinformática de la Unidad de Genómica Funcional del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) quienes analizaron las comparaciones y corrigieron el p-valor (*raw p values*), aplicando la corrección Benjamini-Hochberg para obtener el p-valor ajustado (*adj p values*). El objetivo era minimizar los falsos positivos del estudio (Benjamini Y., Hochberg Y., 1995) y controlar el FDR (*False Discovery Rate*), establecido en el 5%.

Todos los análisis fueron realizados usando el Babelomics *web suite* (Medina I. *et al.*, 2010), una plataforma que integra varias herramientas para el análisis de datos genómicos.

7.3.7 Análisis funcional de los datos de expresión génica

Además de analizar la expresión diferencial de los genes, se realizó un análisis funcional de los mismos, para ello, se utilizaron los bloques funcionales de dos bases de datos, *Gene Ontology* (GO) *Biological processes* y *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) *Pathways*. Aunque estas bases de datos están muy relacionadas entre sí, KEGG se centra en rutas metabólicas, mientras que GO cubre procesos celulares y funciones moleculares. Para encontrar diferencias de expresión entre los bloques funcionales en cada una de las comparaciones establecidas, usamos modelos de regresión previamente descritos (Sartor M.A. *et al.*, 2009; Montaner D., Dopazo J., 2010).

Para cada ruta o proceso biológico se obtuvo un valor de *Log Odds Ratio* (LOR), que proporciona información sobre el enriquecimiento de la vía/proceso. De tal modo que, si en una determinada comparación el valor de LOR es positivo, se considera que el bloque funcional está enriquecido para la primera condición de la comparación, mientras que si el valor es negativo, el bloque funcional está enriquecido en la segunda condición.

Para evaluar si hay diferencias estadísticamente significativas en una determinada comparación, para un proceso biológico o ruta funcional, se usó el estadístico t-limma moderado. Sobre este, se calculó el valor de p y se realizaron correcciones convencionales de *multiple testing* (Benjamini Y., Hochberg Y., 1995).

Al igual que en el estudio de expresión génica diferencial, se definió la significación estadística en $p \leq 0,05$.

8 VALIDACIÓN DE GENES MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR)

Un requisito indispensable en el estudio de expresión génica mediante *microarrays* es la validación de los resultados obtenidos. En este caso, se validaron solo los datos obtenidos en el grupo de los sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento, en las muestras recogidas fuera del periodo de polinización. El objetivo era simular, a nivel de laboratorio, las condiciones ambientales que sufren los alérgicos en contacto con el antígeno, en este caso, los estímulos seleccionados, y no una sobreexposición como sería el estudiar las muestras durante el periodo de polinización.

8.1 SELECCIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO

La población seleccionada para validar los resultados anteriores, estuvo formada por 12 sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento, seleccionados de la población inicial.

8.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las PBMC de los sujetos de estudio (muestras recogidas fuera del periodo de polinización) fueron estimuladas *in vitro* según el Apartado 4 de Materiales y Métodos y, transcurridas 24 horas, se extrajo el RNA según se indica en el Apartado 6 de Materiales y Métodos.

De manera similar al estudio de expresión génica diferencial mediante *microarrays*, las muestras de RNA se analizaron mediante *pools*, siendo estos, mezclas equimolares de RNA procedentes de dos

pacientes distintos (ratio 1:1) para cada una de las condiciones experimentales. Cada *pool* tiene una concentración de RNA estimada de 20 ng/ μ l.

Se analizaron un total de 20 *pools* (5 para cada condición experimental). Todas las muestras analizadas en este caso fueron recogidas fuera del periodo de polinización. Los sujetos participantes en cada *pool* se detallan en la Tabla 17.

Tabla 17. Configuración de los *pools* utilizados en la validación de datos.

Estímulo	Nombre del <i>Pool</i> RNA (1:1)	Sujeto	Estímulo	Nombre del <i>Pool</i> RNA (1:1)	Sujeto
Basal	Basal <i>pool</i> 1	S4.5	Péptido 2+3	P2+3 <i>pool</i> 1	G4.4
		G4.7			J4.4
	Basal <i>pool</i> 2	J4.4		P2+3 <i>pool</i> 2	J4.1
		J4.5			J4.5
	Basal <i>pool</i> 3	J4.2		P2+3 <i>pool</i> 3	J4.2
		G4.5			G4.5
	Basal <i>pool</i> 4	S4.1		P2+3 <i>pool</i> 4	S4.1
		J4.3			J4.3
	Basal <i>pool</i> 5	J4.6		P2+3 <i>pool</i> 5	J4.6
		J4.8			J4.8
Olea	Olea <i>pool</i> 1	S4.5	Péptido 10+12+13	P10+12+13 <i>pool</i> 1	G4.7
		G4.4			J4.4
	Olea <i>pool</i> 2	G4.7		P10+12+13 <i>pool</i> 2	J4.1
		J4.1			J4.5
	Olea <i>pool</i> 3	J4.2		P10+12+13 <i>pool</i> 3	J4.2
		G4.5			G4.5
	Olea <i>pool</i> 4	S4.1		P10+12+13 <i>pool</i> 4	S4.1
		J4.3			J4.3
	Olea <i>pool</i> 5	J4.6		P10+12+13 <i>pool</i> 5	J4.6
		J4.8			J4.8

8.3 SELECCIÓN DE GENES A VALIDAR

De todos los genes que mostraron una expresión diferencial (en el estudio de *microarrays*), entre las distintas condiciones experimentales (presencia o ausencia de estímulo), en el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento; seleccionamos los más relevantes en función de los siguientes criterios:

- **Criterios estadísticos.** Se seleccionaron los genes que tuvieron un *Fold Change* ≥ 2 o ≤ -2 y un p-valor $\leq 0,05$ (sin ajustar) en al menos una de las comparaciones planteadas.
- **Criterios funcionales.** Ser representativos del mayor número posible de rutas y procesos biológicos.

Finalmente y por razones metodológicas, se seleccionaron para su validación 189 genes. Además, se seleccionaron 3 genes endógenos o de referencia comúnmente utilizados en los estudios de expresión génica de PBMC: 18S, GAPDH y $\beta 2$ microglobulina. Con estos 192 genes se diseñaron tarjetas microfluídicas de 384 pocillos (Applied Biosystems) para su estudio, mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

8.4 ANÁLISIS DE MUESTRAS POR qRT-PCR EN TARJETAS MICROFLUÍDICAS

Las muestras de RNA del estudio se enviaron a la Unidad de Genómica del Parque Científico de Cantoblanco-UAM donde se realizaron las validaciones de los genes seleccionados mediante qRT-PCR.

El primer paso es realizar la transcripción reversa, para convertir el RNA en cDNA mediante el kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo de la casa comercial. En primer lugar, se prepara una reacción con un volumen final de 20 μl , de los cuales 4 μl corresponden a la mezcla de reacción *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Applied Biosystems) que incluye enzima retrotranscriptasa, cebadores, MgCl_2 , dNTP y el *buffer* de la reacción en concentraciones optimizadas por el fabricante. Se añade el volumen adecuado de material genético (aproximadamente 200 ng de RNA de cada *pool*) y se ajusta con agua libre de ribonucleasas hasta los 20 μl totales. La reacción de retrotranscripción (paso de RNA a cDNA) se lleva a cabo en un termociclador modelo *GeneAmp PCR System 9.700* (Applied Biosystems) con el siguiente programa: 60 minutos a 37°C y 5 minutos a 95°C.

Los cambios de expresión génica se analizaron mediante tarjetas microfluídicas (TLDA) de 384 pocillos (Applied Biosystems). La expresión de cada gen se detecta mediante sondas *Taqman Gene Expression* (Applied Biosystems). Así, en cada uno de los 384 pocillos se insertan las sondas *Taqman* y los cebadores correspondientes al gen que se quiere analizar. Cada placa tiene 8 puertos por los que se cargan hasta 100 ng de cDNA de cada *pool*, diluidos en 50 μl junto con 50 μl de *Master Mix Taqman Gene Expression* (Applied Biosystems) que contiene AmpliTaq Gold DNA Polimerasa ultrapura, dNTP con dUTP, un fluoróforo de referencia pasiva ROX y componentes de *buffer*, en

concentraciones optimizadas por el fabricante. A continuación, se centrifuga la placa a 1.200 rpm en una centrífuga Heraeus (Thermo Scientific, Rockford, Estados Unidos), durante 2 minutos, para resuspender las sondas Taqman y los cebadores. Posteriormente, se sella la placa con una selladora *Taqman Array Micro Fluidic Card Sealer* (Applied Biosystems) para evitar la evaporación de las muestras. La reacción se llevó a cabo en un sistema de cuantificación a tiempo real 7.900HT System (Applied Biosystems) con el programa SDS Software (Applied Biosystems) durante un total de 40 ciclos (15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C).

En este trabajo se realizaron 20 tarjetas microfluídicas, una tarjeta por cada uno de los *pools* de RNA. En cada una de ellas se analizó la expresión de los 192 genes (189 genes seleccionados más 3 genes de referencia: 18S, GAPDH, β_2 -microglobulina) por duplicado.

8.5 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN GÉNICA OBTENIDOS POR qRT-PCR

Para analizar las diferencias de expresión génica entre las distintas condiciones experimentales estudiadas, PBMC en ausencia/presencia de un estímulo determinado, se siguieron varios pasos:

8.5.1 Normalización, filtrado de los resultados y análisis estadístico

La expresión de cada gen en cada *pool* se calculó en base al ciclo umbral (Ct) en la qRT-PCR, siendo el Ct, el ciclo en el que la expresión del gen comienza a ser exponencial. La expresión de los 189 genes analizados se normalizó respecto a la expresión del gen endógeno 18S (el gen que en nuestro caso daba mayor fiabilidad de los 3 analizados) siguiendo la expresión $\Delta Ct = Ct(\text{gen}) - Ct(18S)$. Aquellas réplicas que presentaron una desviación estándar elevada o cuyo valor Ct fue nulo se descartaron del estudio.

La normalización, el filtrado de datos y el análisis estadístico (se fijó el umbral de significación estadística en $p\text{-valor} \leq 0,05$) de cada una de las comparaciones establecidas, se realizaron mediante el programa StatMiner. Además, con este mismo programa, se clasificaron las muestras según su expresión génica, con un modelo jerárquico no supervisado (*Heat maps*) en el que se agrupan los genes y las muestras (*pools*) de RNA en función de su similitud.

8.6 ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Aquellos genes que mostraron una expresión diferencial estadísticamente significativa en, al menos, una de las comparaciones, fueron reanalizados desde un punto de vista funcional mediante dos programas informáticos: DAVID *Bioinformatics Resources* 6.7 y STRING 9.0.

El programa DAVID *Bioinformatics Resources* 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) permite identificar patrones biológicos enriquecidos, particularmente términos GO, y descubrir genes funcionalmente relacionados. Para ello, se introducen los nombres de los genes en la base de datos y esta, los clasifica en grupos de genes que tienen un rol común. Debido su múltiple funcionalidad, los genes, pueden aparecer en más de un grupo funcional.

Por otro lado, las interacciones de las proteínas codificadas por los genes se analizaron utilizando la base de datos STRING 9.0 (*Known and Predicted Protein-Protein Interactions*) (<http://string-db.org/>). Se introdujo el listado de las proteínas codificadas por los genes con expresión diferencial en la pestaña *Multiple names*. La base de datos devuelve un gráfico con información detallada de cada proteína y sus conexiones con otras. Las conexiones interproteicas las califica como:

- **Neighbourhood (proximidad).** Proteínas con un contexto genómico similar en diferentes especies, lo que sugiere una función parecida.
- **Fusion-fission events (eventos de fusión).** Proteínas fusionadas en algunos genomas, donde muy probablemente funcionan juntas, aunque en otros genomas no estén fusionadas.
- **Occurrence (concordancia).** Proteínas con una función similar o que aparecen en la misma vía metabólica. Suelen expresarse juntas o tener un perfil filogenético similar.
- **Coexpression (coexpresión).** Asociación predictiva entre genes basada en los patrones de expresión simultánea.
- **Experiments (experimentos).** Interacciones proteicas a partir de otras bases de datos de interacciones proteína-proteína.
- **Databases (bases de datos).** Interacciones de grupos de proteínas descritas en las bases de datos.
- **Textmining (anotación).** Interacciones entre grupos de proteínas extraídos a partir de la literatura científica.

Las proteínas con funciones relacionadas tienen distribuciones conectadas y estables en su expresión génica. Esto permite visualizar posibles candidatos para un determinado tipo de respuesta (en este caso, la respuesta alérgica frente a polen de olivo). Con todos estos datos, se mejora el conocimiento acerca de la conectividad de los genes implicados y pueden priorizarse futuros ensayos funcionales.

9 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE *WESTERN-BLOT*

Para comprobar si las modificaciones de expresión de genes encontradas se correlacionan con cambios a nivel proteico, se cuantificaron los niveles de proteínas de algunos genes diferencialmente expresados entre las distintas condiciones experimentales. Para realizar este estudio, se extrajeron las proteínas de PBMC estimuladas durante 72 horas (Apartado 4.3. de Materiales y Métodos), de 10 sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento (en muestras recogidas fuera del periodo de polinización).

9.1 EXTRACCIÓN PROTEICA

La extracción de proteínas se realizó siguiendo el protocolo de extracción de Trizol (Invitrogen). Cada millón de células se resuspende en 800 μ l de Trizol en un tubo Eppendorf de 2 ml y se agita en un agitador tipo *vortex*. A continuación, se añaden 160 μ l de cloroformo (Sigma-Aldrich) y se agita vigorosamente, incubándose a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugan a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C en una microfuga Mikro 24-48 (Hettich AG). Tras la centrifugación observamos tres fases claramente diferenciadas:

- **Fase superior.** Fase acuosa, donde se localiza el RNA.
- **Interfase.** DNA.
- **Fase inferior.** Fenol/cloroformo (fase proteica).

La fase inferior se transfiere a un tubo nuevo y se añaden 240 μ l de etanol 100%. Mezclamos por inversión y se deja a temperatura ambiente de 2 a 3 minutos. Transcurrido ese tiempo, la muestra se centrifuga a 2.000 g durante 5 minutos. Tras la centrifugación, se recoge el sobrenadante y se añaden 1.200 μ l de isopropanol, se agita con un agitador tipo *vortex*, se deja a temperatura ambiente 10 minutos y se centrifuga a 12.000 g durante 10 minutos para posteriormente, desechar el sobrenadante. El *pellet* se resuspende en 1.600 μ l de hidróxido de guanidina en etanol al 95% (0,3M) y se lava a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, la muestra se

centrifuga durante 5 minutos a 7.500 g y se desecha el sobrenadante (este paso de lavado se realiza tres veces). Posteriormente, al *pellet* se añaden 1.600 µl de etanol al 100% y se incuba 20 minutos para luego centrifugar la muestra durante 5 minutos a 7.500 g. Se elimina el sobrenadante y se deja secar durante 10 minutos. Finalmente, el *pellet* proteico se disuelve en 100 µl de dodecilsulfato sódico (SDS) al 1%.

9.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación proteica se realizó siguiendo el método del Ácido Bicinconínico (BCA), utilizando el *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, Rockford, Estados Unidos). El principio de este método reside en que en un medio alcalino los enlaces peptídicos de las proteínas reducen Cu^{2+} y estos, al unirse con moléculas de BCA, absorben luz a 562 nm. La absorción del compuesto es proporcional a la concentración de proteína presente. Para establecer la relación entre una cierta absorción y una determinada concentración de proteína, se prepara una serie de muestras estándares (concentraciones seriadas) de albúmina de suero bovino (BSA), desde 0 µg/ml hasta 2.000 µg/ml. Se pipetea, por duplicado, 25 µl de cada muestra estándar y cada una de las muestras a cuantificar, en placas de 96 pocillos (Costar, Cambridge, Estados Unidos). A cada pocillo se le añaden 100 µl del *BCA Working Reagent* (WR) preparado a partir de la mezcla de 50 partes del *BCA Reagent A* con 1 parte del *BCA Reagent B*. La placa se incuba a 37°C durante 30 minutos para que se lleve a cabo la reacción y posteriormente, se mide la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro de placas, en este caso se usó el *Infinite F200* (Tecan, Männedorf, Suiza).

Cuando se han obtenido los valores de absorbancias, se realiza una regresión lineal con los valores obtenidos para las muestras estándares. En el eje de las X se indican la concentración en µg/ml y en el de las Y, la absorción, en unidades de absorción. Finalmente se interpola el valor de absorbancia que hemos obtenido para la muestra a cuantificar, para determinar la concentración proteica de la misma.

9.3 ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

La electroforesis se realizó con la tecnología *Novex* de Life Technologies (Carlsbad, California, Estados Unidos). Se desnaturalizaron alícuotas de 10 µg de proteína, de cada una de las condiciones experimentales, a 70°C durante 10 minutos en presencia del agente reductor (*Bolt Reducing Agent*) y del tampón de carga (*LDS Sample Buffer*). Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 12%. Como tampón de electroforesis se usó el tampón Tris-Glicina: Tris base (1,5 M), glicina (0,2 M), SDS (0,1%). La electroforesis se resolvió con el sistema *Bolt Mini Gel Tank* a 135

V (voltios) durante 90 minutos. Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa con el sistema semiseco *Blot Dry System* de Life Technologies, siguiendo instrucciones del fabricante. La transferencia se realizó con un programa de 7 minutos, primero a 20 V durante 1 minuto, seguido de 23 V durante 4 minutos, para finalizar con 25 V durante 3 minutos.

Para comprobar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, se tiñe con Rojo Ponceau al 0,1% (peso/volumen) en 5% de ácido acético (Sigma Aldrich) durante 1 minuto. Una vez que se visualizan las bandas proteicas, las membranas se lavan con agua destilada para iniciar el proceso de inmunodetección.

9.4 INMUNODETECCIÓN

El proceso de inmunodetección se realizó utilizando el *WesterBreeze Chemiluminescent Western Blot kit* (Invitrogen).

El primer paso es el bloqueo de la membrana de nitrocelulosa en la que se encuentran las proteínas, con 10 ml de la solución de bloqueo, *Blocking Solution* (preparada con 7 ml de agua destilada, 2 ml de la solución *Blocker/Diluent Part A* y 1 ml de la solución *Blocker/Diluent Part B*), durante 30 minutos en agitación. Transcurrido ese tiempo, la membrana se lava sucesivas veces con agua destilada para incubarla con anticuerpos específicos de la proteína que se quiere estudiar. En este caso utilizamos los anticuerpos primarios IgG policlonales específicos de anti- β -ACTINA, anti-EBI3 (virus 3 inducido por *Epstein-Barr*), anti-FPR3 (receptor 3 del péptido formil) y anti-TREM1 (receptor iniciador 1 expresado en células mieloides) sintetizados en conejo, (Tabla 18), diluidos en solución de bloqueo (*Blocking Solution*). La incubación se realiza en agitación durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las membranas se lavan con 20 ml de la solución de lavado (preparada a partir de 15 partes de agua destilada por cada parte del *Antibody Wash Solution*) durante 5 minutos (3 veces) para posteriormente incubarlas con 10 ml del anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina, suministrado en el kit, [*Secondary Antibody Solution* (IgG anti-rabbit)] durante 30 minutos y en agitación. A continuación, se realizan tres lavados de la membrana con la solución de lavado y se inicia el revelado, aplicando 1 ml de *Chemiluminescent Substrate* (previamente preparado) que se deja a temperatura ambiente durante cinco minutos. Transcurrido el tiempo se elimina el excedente del líquido secando con papel de filtro. La impresión de la imagen se realiza con papel fotográfico *Amersham Hyperfilm ECL* (GE Healthcare).

Tabla 18. Características de los anticuerpos utilizados.

Anticuerpo primario	Realizado en	Dilución utilizada	Casa Comercial
IgG Anti- β -ACTINA humano	Conejo	1/1.000	Cell Signaling
IgG Anti-EBI3 humano	Conejo	1/200	Santa Cruz
IgG Anti-FPR3 humano	Conejo	1/300	Abcam
IgG Anti-TREM1 humano	Conejo	1/200	Santa Cruz

La película fotográfica, expuesta a quimioluminiscencia, se reveló en una cámara oscura, con una reveladora. Los tiempos de revelado oscilaron en función del anticuerpo utilizado (entre 30 segundos y 10 minutos). La imagen resultante se digitalizó usando el *Gel Doc EZ Imagen* (Bio-Rad) y el análisis de los resultados se realizó mediante densitometría con el *Quantity One 1-D Analysis Software* (Bio-Rad). Cada banda obtenida (para cada condición experimental y anticuerpo) se relativizó a la obtenida para la β -ACTINA.

Tras el revelado, algunas de las membranas de nitrocelulosa se deshibridaron mediante la solución *Re-blot Plus* (Millipore, California, Estados Unidos), con una dilución 1:20 en agua destilada para, posteriormente, volverlas a hibridar con otro de los anticuerpos.

10 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN E INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE PBMC

Siguiendo los criterios de selección, clasificación y nomenclatura de los sujetos de estudio, durante los meses de marzo y abril del año 2014 (fuera del periodo de polinización) recibimos muestras de sangre de una nueva población de 8 sujetos alérgicos al polen de olivo y 5 sujetos controles sanos, (seleccionados con los criterios establecidos previamente (Apartados 1.1 y 1.2 de Materiales y Métodos). Estas muestras se procesaron según Apartado 2 de Materiales y Métodos.

Los ensayos consistieron en medir el porcentaje de proliferación que inducían determinados estímulos relacionados con el polen de olivo, bajo 5 condiciones distintas, utilizando como control positivo el mitógeno PHA, a una concentración de 2,5 μ g/ml en las PBMC extraídas:

1. PBMC cultivadas sin ningún estímulo (condición Basal).
2. PBMC cultivadas en presencia de Olea (25 μ g/ml).
3. PBMC cultivadas en presencia del Péptido 2+3 (5 μ g/ml).

4. PBMC cultivadas en presencia del Péptido 10+12+13 (5 µg/ml).
5. PBMC cultivadas en presencia de los Péptidos 2+3 (5 µg/ml) y 10+12+13 (5 µg/ml).

En estos mismos ensayos se midió la capacidad de inhibición de la respuesta proliferativa por parte de los Péptidos:

- Ensayos de reversión de la respuesta específica frente a Olea:
 1. PBMC cultivadas en presencia de Olea (25 µg/ml) y 24 horas después se añadió al medio de cultivo el Péptido 2+3 (5 µg/ml).
 2. PBMC cultivadas en presencia de Olea (25 µg/ml) y 24 horas después se añadió al medio de cultivo el Péptido 10+12+13 (5 µg/ml).
 3. PBMC cultivadas en presencia de Olea (25 µg/ml) y 24 horas después se añadió al medio de cultivo los Péptidos 2+3 (5 µg/ml) y 10+12+13 (5 µg/ml).
- Ensayos de preestimulación con los Péptidos (inhibición previa de la respuesta proliferativa):
 1. PBMC cultivadas en presencia del Péptido 2+3 (5 µg/ml) y 24 horas después se añadió al medio de cultivo Olea (25 µg/ml).
 2. PBMC cultivadas en presencia del Péptido 10+12+13 (5 µg/ml) y 24 horas después se añadió al medio de cultivo Olea (25 µg/ml).
 3. PBMC cultivadas en presencia de los Péptidos 2+3 (5 µg/ml) y 10+12+13 (5 µg/ml) y 24 horas después se añadió al medio de cultivo Olea (25 µg/ml).

Se cultivaron 200 µl de la suspensión celular a una concentración de 1.10^6 células/ml, en medio de cultivo completo, en placas de 96 pocillos con fondo en U (Costar).

A los seis días de incubación, las placas se centrifugaron a 675 g. Se retiró el sobrenadante y se añadió al *pellet* celular de cada pocillo, 100 µl de medio de RPMI-1640 (Lonza) no suplementado. Para determinar el índice de estimulación se utilizó el *Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega). Es un sistema colorimétrico que permite determinar el número de células viables en proliferación. La efectividad de la técnica radica en que el *MTS tetrazolium* es reducido por las células a formazán, producto coloreado y soluble en medio de cultivo, cuyos

niveles de absorbancia se detectan a 490 nm. Esta reacción está acoplada a la producción de NADPH producida por enzimas deshidrogenasas en células metabólicamente activas. Así, a cada pocillo, se le añadieron 20 μ l de este producto y se dejó actuar durante 90 minutos a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂. Para medir la absorbancia (Abs) se utilizó un espectrofotómetro de placas *Infinite F200* (Tecan). En la cuantificación, se restó a cada valor, el valor de absorbancia obtenido en los pocillos blanco: con medio de cultivo RPMI-1640 (Lonza) pero sin células; de modo que Abs= Abs para cada condición experimental- Abs medio cultivo.

Se realizó la media de las absorbancias obtenidas para cada condición experimental de cada uno de los pacientes, y se calculó el índice de estimulación como el cociente entre la absorbancia media obtenida para condición experimental respecto a la obtenida en la condición Basal, considerando siempre que la relación de absorbancia obtenida entre el PHA/Basal debía ser superior a 1. Para referenciar la capacidad inmunomoduladora o de inhibición de los péptidos, se tomó como referencia el resultado de las muestras estimuladas con Olea, al que se le otorgó el valor de 100 y sobre el que se relativizó el I.E. de las demás muestras.

11 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos en el estudio de anticuerpos, citocinas, niveles de expresión proteica y ensayos de proliferación celular se analizaron utilizando los test análisis de la varianza (ANOVA), test de Fisher, test χ^2 y t de Student (para muestras pareadas y no pareadas) según el caso. Para ello se utilizó el programa estadístico Graphpad InStat 3. La significación estadística fue establecida a partir $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Las características demográficas y clínicas de los 84 sujetos de estudio se resumen en la Tabla 19.

Tabla 19. Características demográficas y clínicas de los sujetos de estudio.

Grupo clínico	N	Edad (años)	Sexo (%) mujer /hombre	Diagnóstico clínico
Grupo 1: Sujetos no alérgicos	17	40,3 ± 13,3 ⁵	44/56 ^{4,5}	Sanos
Grupo 2: Sujetos asintomáticos*	10	33,6 ± 6,6	60/40	Subclínicos 27,7% Anafilaxia
Grupo 3: Sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo	20	33,5 ± 12,2	42/58 ^{4,5}	16,6% Reacción a picadura de insecto 38,8% Asma/Rinitis 16,6% Rinitis
Grupo 4: Sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento	22	35,2 ± 11,7	76/24 ^{1,3}	86,6% Asma/Rinitis 13,3% Rinitis
Grupo 5: Sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con inmunoterapia específica (AIT)	15	30,8 ± 10,4 ¹	87/13 ^{1,3}	**83,3% Asma/Rinitis 16,6% Rinitis

*Pruebas cutáneas positivas al extracto de *Olea europaea*, pero sin síntomas clínicos. **Los síntomas reflejados por los pacientes del grupo 5 son los que presentaron antes del tratamiento específico. ¹ Diferencias estadísticamente significativas con el grupo 1. ³ Diferencias estadísticamente significativas con el grupo 3. ⁴Diferencias estadísticamente significativas con el grupo 4. ⁵ Diferencias estadísticamente significativas con el grupo 5 ($p \leq 0,05$).

1.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

En el momento de la recogida de las muestras, el grupo que presentaba la mayor edad media fue el de los sujetos no alérgicos (40,3 ± 13,3 años). La menor edad media correspondió al grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo tratados con inmunoterapia específica (AIT) (30,8 ± 10,4 años), siendo las diferencias de edad estadísticamente significativas entre estos dos grupos.

En cuanto al género, se reclutaron un mayor porcentaje de mujeres en los grupos de sujetos alérgicos al polen de olivo, tanto con tratamiento (87%) como sin él (76%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas al compararlas con los grupos de sujetos no alérgicos (44%) y pacientes alérgicos no sensibilizados al polen de olivo (42%).

1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Los 17 sujetos incluidos en el grupo de no alérgicos se diagnosticaron como sanos tras la exploración física y no mostraron resultado positivo frente a ningún extracto alérgico en las pruebas cutáneas.

Los 10 sujetos incluidos en el grupo de sujetos asintomáticos, no referían sintomatología alérgica aunque presentaron test cutáneo positivo frente al extracto de polen de olivo.

De los 20 sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo (grupo 3), el 27,7% había sufrido al menos un episodio de anafilaxia (en su mayoría causada por medicamentos), el 16,6% había experimentado algún tipo de reacción a picadura de insecto, el 38,8% refería asma y rinitis y el 16,6% solo rinitis. Todos ellos presentaron, al menos, un resultado positivo en las pruebas cutáneas frente a otros pólenes diferentes del olivo, a epitelio animal (perro, gato) y/o ácaros.

El grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento incluyó 22 sujetos con pruebas cutáneas positivas frente al extracto de polen de olivo, que nunca habían sido tratados para esta alergia. Clínicamente, presentaban en su mayoría asma y rinitis (86,6%), aunque un pequeño porcentaje padecía solo rinitis (13,3%).

Los pacientes alérgicos al polen de olivo tratados con AIT (n=15) mejoraron su sintomatología clínica tras el tratamiento. Los síntomas reflejados en la Tabla 19 son los que presentaron los pacientes antes del tratamiento específico.

2 NIVELES DE IgE TOTAL Y ANTICUERPOS IgE ESPECÍFICOS FRENTE AL EXTRACTO COMPLETO DE POLEN DE *Olea europaea* EN SUERO

Para caracterizar la población de estudio, se cuantificaron los niveles de IgE total y anticuerpos IgE específicos frente al extracto de polen de *Olea europaea* en suero. Las Figuras 13 y 14 muestran los niveles medios obtenidos en cada grupo, destacando las diferencias significativas entre ellos.

En el análisis de los datos de IgE total (Figura 13), los niveles medios más bajos se encontraron en el grupo de sujetos no alérgicos, tanto durante como fuera del periodo de polinización (Unidades Internacionales por mililitro, UI/ml, expresados en medias \pm desviación estándar) ($70,10 \pm 91,00$ UI/ml y $75,80 \pm 79,00$ UI/ml respectivamente), mientras que los mayores niveles se observaron en el

grupo de sujetos asintomáticos ($450,00 \pm 790,00$ UI/ml durante la polinización; $462,00 \pm 488,00$ UI/ml, fuera).

Durante el periodo de polinización, la única diferencia estadísticamente significativa se encontró entre el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento ($191,30 \pm 194,00$ UI/ml) y el grupo de sujetos no alérgicos ($70,10 \pm 91,00$ UI/ml) (Figura 13 A).

Fuera del periodo de polinización, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en varias comparaciones. Los niveles de IgE total en el grupo de sujetos no alérgicos ($75,80 \pm 79,00$ UI/ml) fueron significativamente menores que los niveles medios encontrados para el resto de los grupos. A su vez, los sujetos asintomáticos presentaron niveles significativamente mayores ($462,00 \pm 488,00$ UI/ml) que los sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo ($179,90 \pm 164,00$ UI/ml) y que los pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento ($186,70 \pm 173,00$ UI/ml).

No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos clínicos cuando se compararon los niveles entre los dos periodos de estudio.

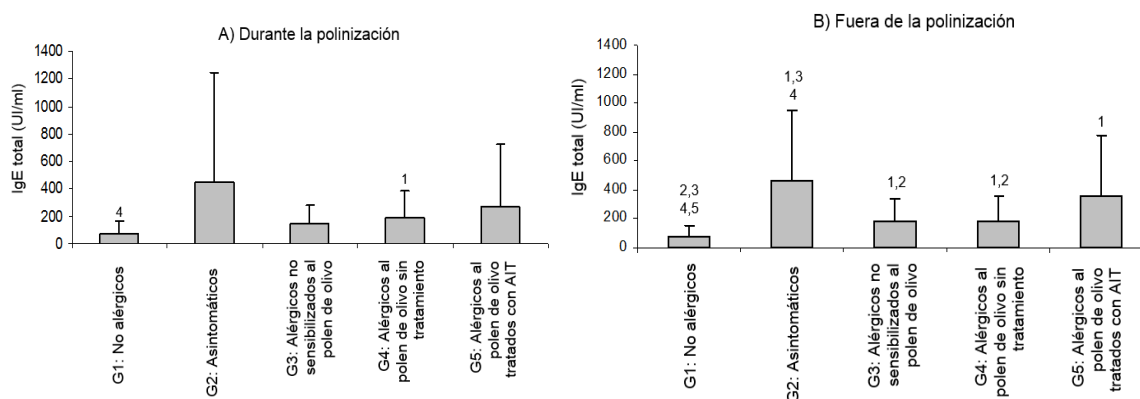


Figura 13. Niveles medios de IgE total. A) Durante el periodo de polinización. B) Fuera del periodo de polinización. ¹ Diferencias estadísticamente significativas con el grupo 1. ² Diferencias estadísticamente significativas con el grupo 2. ³ Diferencias estadísticamente significativas con el grupo 3. ⁴ Diferencias estadísticamente significativas con el grupo 4. ⁵ Diferencias estadísticamente significativas con el grupo 5 ($p \leq 0,05$).

Respecto a los niveles de anticuerpos IgE específicos frente al extracto de polen de *Olea europaea* (Figura 14) (valores medios expresados en kilo Unidades Arbitrarias por litro, kUA/l), los pacientes alérgicos al polen de olivo, tanto los sujetos sin tratamiento como los tratados (pacientes sin tratamiento: $23,12 \pm 20,00$ kUA/l durante la polinización, $45,70 \pm 41,00$ kUA/l fuera de la polinización; pacientes tratados con AIT: $25,80 \pm 33,00$ kUA/l durante la polinización, $46,29 \pm 43,00$ kUA/l fuera de la polinización) son los que mostraron niveles significativamente mayores comparado con el resto de los grupos, tanto en las muestras extraídas durante como fuera del

periodo de polinización (sujetos no alérgicos: $\leq 0,35$ kUA/l durante la polinización, $\leq 0,35$ kUA/l fuera de la polinización; sujetos asintomáticos: $3,26 \pm 7,40$ kUA/l durante la polinización, $1,88 \pm 1,20$ kUA/l fuera de la polinización; pacientes alérgicos no sensibilizados al polen de olivo: $\leq 0,35$ kUA/l durante la polinización, $0,50 \pm 0,38$ kUA/l fuera de la polinización). Además, fuera del periodo de polinización, los sujetos asintomáticos mostraron niveles medios significativamente mayores ($1,88 \pm 1,20$ kUA/l) que los sujetos no alérgicos ($\leq 0,35$ kUA/l) y que los pacientes alérgicos no sensibilizados al polen de olivo ($0,50 \pm 0,38$ kUA/l).

Comparando los niveles medios de anticuerpos IgE específicos en cada grupo en función del periodo de recogida de las muestras, solo el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento mostró diferencias estadísticamente significativas: los niveles medios obtenidos fuera del periodo de polinización fueron más elevados ($45,70 \pm 41,00$ kUA/l) que los encontrados durante la polinización ($23,12 \pm 20,00$ kUA/l).

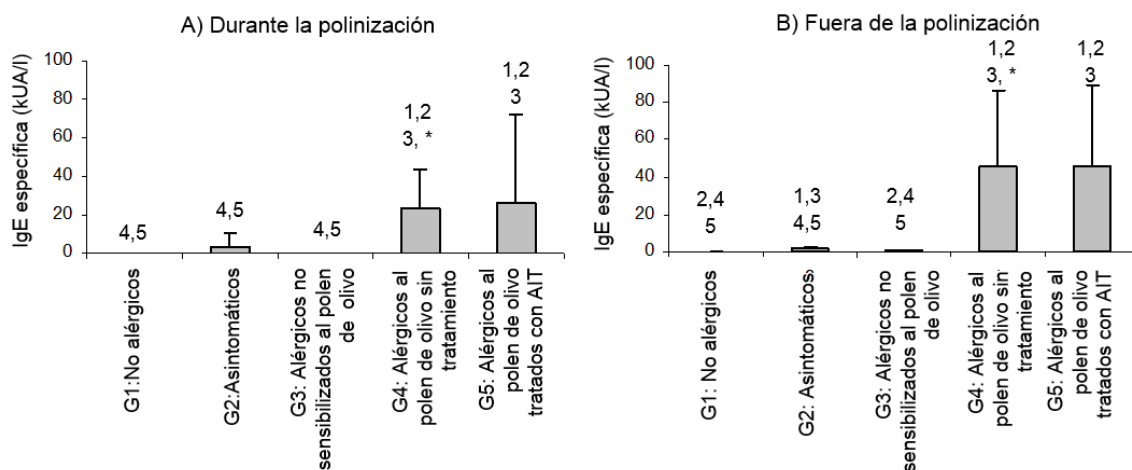


Figura 14. Niveles medios de anticuerpos IgE específicos frente al extracto completo de polen de *Olea europaea*. A) Durante el periodo de polinización. B) Fuera del periodo de polinización. ¹ Diferencias estadísticamente significativas con el grupo 1. ² Diferencias estadísticamente significativas con el grupo 2. ³ Diferencias estadísticamente significativas con el grupo 3. ⁴ Diferencias estadísticamente significativas con el grupo 4. ⁵ Diferencias estadísticamente significativas con el grupo 5. * Indica las diferencias estadísticamente significativas encontradas entre los dos periodos de exposición al alérgeno en el mismo grupo clínico (como sucede en el grupo de los pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento) ($p \leq 0,05$).

3 NIVELES DE CITOCINAS SOLUBLES EN SOBRENADANTES DE PBMC ESTIMULADAS

Con el fin de determinar patrones de respuesta celular diferenciales entre grupos clínicos, para cada estímulo y periodo de recogida de las muestras, se cuantificaron los niveles de las siguientes citocinas: IL-2, IFN- γ (citocina de tipo Th1), citocinas de tipo Th2 (IL-5, IL-4, IL-13), TNF- α y citocinas

reguladoras (IL-10, TGF- β) en los sobrenadantes de los ensayos de estimulación de PBMC (siguiendo los protocolos detallados en el Apartado 5 de Materiales y Métodos).

3.1 ANÁLISIS GLOBAL DE SECRECIÓN DE CITOCINAS EN LOS CINCO GRUPOS CLÍNICOS

Globalmente, los resultados de las citocinas analizadas no mostraron un perfil diferencial claro de respuesta. A pesar de que las células respondieron correctamente frente al PHA, mitógeno utilizado como control, muchas de las citocinas mostraron valores muy bajos, a excepción de las citocinas reguladoras y TNF- α .

La Tabla 20 resume los niveles medios de cada citocina en cada grupo clínico, para cada condición experimental (los niveles se expresan en forma de promedio de los *pools* de muestras analizadas \pm desviación estándar; las unidades de cuantificación vienen expresadas en pg/ml). En la Tabla 20 A), B), C), D), E) se indican las diferencias estadísticamente significativas para cada una de las comparaciones planteadas:

3.1.1 Comparaciones entre los grupos clínicos, en muestras sin estimular, en el mismo periodo de exposición al alérgeno. Con la finalidad de establecer un patrón de secreción basal, diferencial entre los grupos clínicos.

3.1.2 Comparaciones entre las distintas condiciones experimentales y periodos de exposición al alérgeno en cada uno de los grupos clínicos (comparaciones intragrupo).

3.1.1 Comparaciones entre los grupos clínicos, en muestras sin estimular, en el mismo periodo de exposición al alérgeno

Las comparaciones entre las muestras basales reflejan, en general, unos niveles medios de citocinas más elevados en los sujetos no alérgicos. Estas diferencias son significativas en los niveles medios de IL-2 (Tabla 20 A), respecto a los grupos de sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo y a los sujetos alérgicos sin tratamiento (grupos 3 y 4), en las muestras extraídas durante el periodo de polinización, e IFN- γ (Tabla 20 B), respecto a los grupos 3 (sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo) y 5 (pacientes alérgicos al polen de olivo tratados con AIT), durante el periodo de polinización y frente a este mismo grupo, fuera del periodo. El grupo de sujetos asintomáticos, mostró las mismas diferencias que el grupo de sujetos no alérgicos, acorde a estas dos citocinas.

Respecto a los niveles basales de citocinas Th2 (Tabla 20 C), los niveles de IL-4 e IL-5, aunque muy bajos en general, también fueron más altos en los sujetos no alérgicos respecto a los sujetos alérgicos, aunque las diferencias solo fueron significativas para la IL-4, en el periodo de polinización, entre el grupo de sujetos no alérgicos y los grupos de asintomáticos y alérgicos al polen de olivo tratados con AIT, así como, en asintomáticos respecto al grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo tratados. Fuera del periodo de polinización, se observaron estas mismas diferencias y además, entre el grupo de sujetos no alérgicos y el grupo de sujetos alérgicos al polen olivo sin tratamiento, así como, entre sujetos alérgicos al polen de olivo con y sin tratamiento, mostrando menores niveles los sujetos tratados. Los niveles de IL-5 fueron, en muchos casos indetectables y solo mostraron diferencias significativas al comparar el grupo de sujetos no alérgicos con el de sujetos asintomáticos, durante el periodo de polinización. Los niveles de IL-13 fueron indetectables en todas las muestras.

En relación a los niveles basales de TNF- α (Tabla 20 D) fueron más elevados en el grupo de sujetos no alérgicos que en el resto, en los dos periodos de estudio, aunque destacablemente más altos durante el periodo de polinización. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre este grupo y el grupo 3 (alérgicos no sensibilizados al polen de olivo) y 5 (sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con AIT), durante la polinización y frente a todos los grupos, fuera del periodo de polinización. Además, durante el periodo de polinización, hubo diferencias entre todos los grupos y el grupo 5, que mostró los niveles más bajos.

Finalmente, los niveles basales de citocinas reguladoras (Tabla 20 E) fueron, en general, más altos que las anteriores. Destacan, en el periodo de polinización, los menores niveles de IL-10 en el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo con tratamiento respecto a todos los demás. Fuera del periodo, estos mismos sujetos presentaron los menores niveles en comparación con los obtenidos en los grupos de no alérgicos, asintomáticos y alérgicos al polen de olivo sin tratamiento. Además de estas diferencias, el grupo de sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo, también mostraron niveles muy bajos, significativamente menores a los obtenidos en los grupos de sujetos no alérgicos, asintomáticos y alérgicos al polen de olivo sin tratamiento. En relación a los niveles de TGF- β , destaca en el periodo de polinización, cómo los mayores niveles se observaron en el grupo de sujetos asintomáticos, seguido de sujetos alérgicos tratados con AIT. Ambos grupos mostraron diferencias significativas respecto al grupo de sujetos no alérgicos y los pacientes alérgicos sin tratamiento. Curiosamente, fuera del periodo de polinización, el grupo de sujetos asintomáticos mostró los menores niveles de esta citocina, con diferencias significativas respecto a todos los grupos, excepto el grupo 4 (alérgicos al polen de olivo sin tratamiento). El

grupo de pacientes alérgicos tratados con AIT mostró los niveles más altos, con diferencias significativas respecto a los grupos de sujetos no alérgicos, asintomáticos y alérgicos al polen de olivo no tratados. Además, el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento, mostró unos niveles significativamente menores que los sujetos no alérgicos y alérgicos no sensibilizados al polen de olivo (grupo 3).

3.1.2 Comparaciones entre las distintas condiciones experimentales y periodos de exposición al alérgeno en cada uno de los grupos clínicos (comparaciones intragrupo)

Las comparaciones realizadas entre los estímulos y el momento de recogida de las muestras, para cada grupo, quedan resumidas en la Tabla 20. Se establecieron dos tipos:

- Comparaciones entre las distintas condiciones experimentales para un mismo periodo de exposición al alérgeno, con el fin de determinar perfiles de comportamiento de cada grupo frente a los estímulos utilizados.
- Comparaciones entre los dos periodos de exposición al antígeno (durante vs fuera del periodo de polinización) para cada una de las condiciones experimentales, con la finalidad de evaluar la influencia de la carga ambiental en la respuesta frente al estímulo.

Estas comparaciones no se detallan en el texto debido a la ausencia de un comportamiento claro y biológicamente relevante. Por ello, se decidió centrar el análisis en las comparaciones más extremas desde el punto de vista clínico: las existentes entre el grupo de sujetos no alérgicos y los sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento (como se detallan en el Apartado 3.2 de Resultados).

Tabla 20. Niveles medios de citocinas por grupos de estudio y periodo analizado. Valores expresados en pg/ml. A) IL-2. B) Niveles medios de la citocina Th1: IFN- γ . C) Niveles medios de citocinas Th2: C.1. IL-4, C.2. IL-5, C.3. IL-13. D) TNF- α . E) Niveles medios de citocinas Treg : E.1. IL-10, E.2. TGF- β .

A) Niveles medios de IL-2 (pg/ml).

Grupo clínico	Basal		Olea		Péptido 2+3		Péptido 10+12+13	
	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización
Grupo 1: Sujetos no alérgicos (n=15)	^{3,4} 1,31 ± 1,22*	2,78 ± 2,41*	0,83 ± 0,82*	2,30 ± 2,00*	1,44 ± 1,31	2,73 ± 2,37	1,82 ± 1,73	3,00 ± 1,52
Grupo 2: Sujetos asintomáticos (n=7)	^{3,4} 1,67 ± 0,71	2,05 ± 2,07	2,21 ± 2,63	1,72 ± 0,74	2,53 ± 3,07	1,21 ± 1,19	1,67 ± 1,68	0,91 ± 1,32
Grupo 3: Sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo (n=15)	^{1,2} 0,13 ± 0,22	0,00 ± 0,00	0,31 ± 0,53	0,39 ± 0,68	0,22 ± 0,39	0,14 ± 0,21	0,41 ± 0,72	0,11 ± 0,20
Grupo 4: Sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento (n=15)	^{1,2} 0,20 ± 0,35* ^{P10+12+13}	1,48 ± 1,85* ^{P2+3,P10+12+13}	0,53 ± 0,91	0,55 ± 1,09	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,41 ^B	0,70 ± 0,64 ^B	0,36 ± 0,73 ^B
Grupo 5: Sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con AIT (n=12)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,31 ± 0,53	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,81 ± 0,93	0,00 ± 0,00

Los números situados a la izquierda indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos, a nivel basal, dentro del mismo periodo. 1: Grupo 1, 2: Grupo 2, 3: Grupo 3, 4: Grupo 4, 5: Grupo 5. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los dos periodos analizados. Los símbolos situados a la derecha, indican frente a qué muestra, dentro del mismo periodo y grupo de estudio, hay diferencias significativas. B: Basal, O: Olea, P2+3: Péptidos 2+3, P10+12+13: Péptidos 10+12+13.

B) Niveles medios de la citocina Th1: IFN- γ (pg/ml).

Grupo clínico	Basal		Olea		Péptido 2+3		Péptido 10+12+13	
	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización
Grupo 1: Sujetos no alérgicos (n=15)	^{3,5} 1,49 ± 0,83	⁵ 2,21 ± 1,54	1,21 ± 1,04*	2,70 ± 1,62*	1,45 ± 1,03*	2,78 ± 2,14*	1,32 ± 1,01	2,20 ± 1,66
Grupo 2: Sujetos asintomáticos (n=7)	^{3,5} 1,60 ± 1,37	⁵ 1,39 ± 1,76	2,40 ± 3,40	2,25 ± 0,56 ^{P10+12+13}	1,53 ± 1,75	1,81 ± 0,88 ^{P10+12+13}	1,17 ± 1,01	0,79 ± 0,48 ^{O,P2+3}
Grupo 3: Sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo (n=15)	^{1,2} 0,14 ± 0,24 ²⁺³	0,00 ± 0,00	0,46 ± 0,79	0,00 ± 0,00	2,73 ± 4,72 ^B	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Grupo 4: Sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento (n=15)	0,00 ± 0,00	⁵ 3,32 ± 4,71	0,35 ± 0,61	1,08 ± 1,24	1,06 ± 1,83	0,00 ± 0,00	0,56 ± 0,97	0,00 ± 0,00
Grupo 5: Sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con AIT (n=12)	^{1,2} 0,07 ± 0,11	^{1,2,4} 0,04 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,04	5,64 ± 9,53	0,25 ± 0,42	0,20 ± 0,35	0,07 ± 0,12

Los números situados a la izquierda indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos, a nivel basal, dentro del mismo periodo. 1: Grupo 1, 2: Grupo 2, 3: Grupo 3, 4: Grupo 4, 5: Grupo 5. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los dos periodos analizados. Los símbolos situados a la derecha, indican frente a qué muestra, dentro del mismo periodo y grupo de estudio, hay diferencias significativas. B: Basal, O: Olea, 2+3: Péptidos 2+3, 10+12+13: Péptidos 10+12+13.

C) Niveles medios de citocinas Th2.

C.1. IL-4 (pg/ml).

Grupo clínico	Basal		Olea		Péptido 2+3		Péptido10+12+13	
	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización
Grupo 1: Sujetos no alérgicos (n=15)	2,51,32 ± 0,64 ^{P2+3}	2,4,51,44 ± 0,48 ^{O,P2+3}	1,44 ± 0,53 ^{*,P2+3,P10+12+13}	2,13 ± 1,17 ^{*,B,P10+12+13}	2,02 ± 0,67 ^{*,B,O,P10+12+13}	2,71 ± 0,98 ^{*,B,P10+12+13}	0,97 ± 0,26 ^{O,P2+3}	1,33 ± 0,63 ^{O,P2+3}
Grupo 2: Sujetos asintomáticos (n=7)	1,50,64 ± 0,56	1,50,72 ± 0,65	0,77 ± 1,33	0,57 ± 0,99	2,06 ± 1,79	1,00 ± 0,97	0,67 ± 1,17	0,75 ± 1,31
Grupo 3: Sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo (n=15)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,32 ± 0,55 ^{P2+3}	0,24 ± 0,42 ^{P2+3}	2,90 ± 1,40 ^{*,O,P10+12+13}	1,43 ± 1,25 ^{*,O}	0,22 ± 0,38 ^{P2+3}	0,00 ± 0,00
Grupo 4: Sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento (n=15)	0,00 ± 0,00	1,50,66 ± 0,76	0,39 ± 0,67 ^{*,P2+3}	1,11 ± 1,03 [*]	1,50 ± 1,40 ^{O,P10+12+13}	0,78 ± 0,97	0,24 ± 0,41 ^{P2+3}	0,00 ± 0,00
Grupo 5: Sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con AIT (n=12)	1,20,12 ± 0,21 ^{P2+3}	1,2,40,16 ± 0,28 ^{P2+3}	0,27 ± 0,46	0,25 ± 0,43 ^{P2+3}	0,72 ± 0,63 ^B	0,93 ± 0,88 ^{B,O,P10+12+13}	0,55 ± 0,95	0,30 ± 0,51 ^{P2+3}

Los números situados a la izquierda indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos, a nivel basal, dentro del mismo periodo. 1: Grupo 1, 2: Grupo 2, 3: Grupo 3, 4: Grupo 4, 5: Grupo 5. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los dos periodos analizados. Los símbolos situados a la derecha, indican frente a qué muestra, dentro del mismo periodo y grupo de estudio, hay diferencias significativas. B: Basal, O: Olea, 2+3: Péptidos 2+3, 10+12+13: Péptidos 10+12+13.

C.2. IL-5 (pg/ml).

Grupo clínico	Basal		Olea		Péptido 2+3		Péptido 10+12+13	
	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización
Grupo 1: Sujetos no alérgicos (n=15)	² 0,46 ± 0,14*	0,26 ± 0,26 ^{*,O}	0,41 ± 0,23*	0,64 ± 0,04 ^{*,B,P2+3,P10+12+13}	0,36 ± 0,15*	0,24 ± 0,03 ^{*,O}	0,40 ± 0,04	0,29 ± 0,26 ^O
Grupo 2: Sujetos asintomáticos (n=7)	¹ 0,21 ± 0,19	0,15 ± 0,26	0,20 ± 0,35	0,18 ± 0,30	0,16 ± 0,27	0,24 ± 0,25	0,14 ± 0,23	0,26 ± 0,46
Grupo 3: Sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo (n=15)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Grupo 4: Sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento (n=15)	0,00 ± 0,00	0,32 ± 0,63	0,07 ± 0,12*	0,46 ± 0,68*	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Grupo 5: Sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con AIT (n=12)	0,24 ± 0,41	0,24 ± 0,40	0,46 ± 0,42 ^{P2+3}	0,00 ± 0,00	0,13 ± 0,23 ^O	0,17 ± 0,30	0,35 ± 0,61	0,19 ± 0,32

Los números situados a la izquierda indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos, a nivel basal, dentro del mismo periodo. 1: Grupo 1, 2: Grupo 2, 3: Grupo 3, 4: Grupo 4, 5: Grupo 5. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los dos periodos analizados. Los símbolos situados a la derecha, indican frente a qué muestra, dentro del mismo periodo y grupo de estudio, hay diferencias significativas. B: Basal, O: Olea, 2+3: Péptidos 2+3, 10+12+13: Péptidos 10+12+13.

C.3. IL-13 (pg/ml).

Grupo clínico	Basal		Olea		Péptido 2+3		Péptido 10+12+13	
	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización
Grupo 1: Sujetos no alérgicos (n=15)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Grupo 2: Sujetos asintomáticos (n=7)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,24
Grupo 3: Sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo (n=15)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Grupo 4: Sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento (n=15)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,59 ± 1,18	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,39 ± 0,78
Grupo 5: Sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con AIT (n=12)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,40 ± 0,35	0,00 ± 0,00	0,49 ± 0,85	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Los números situados a la izquierda indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos, a nivel basal, dentro del mismo periodo. 1: Grupo 1, 2: Grupo 2, 3: Grupo 3, 4: Grupo 4, 5: Grupo 5. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los dos periodos analizados. Los símbolos situados a la derecha, indican frente a qué muestra, dentro del mismo periodo y grupo de estudio, hay diferencias significativas. B: Basal, O: Olea, 2+3: Péptidos 2+3, 10+12+13: Péptidos 10+12+13.

D) Niveles medios de TNF- α (pg/ml).

Grupo clínico	Basal		Olea		Péptido 2+3		Péptido 10+12+13	
	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización
Grupo 1: Sujetos no alérgicos (n=15)	^{3,5} 55,08 \pm 64,80 ^{*,P2+3}	^{2,3,4,5} 6,61 \pm 1,61 ^{*,O,P2+3,P10+12+13}	99,67 \pm 115,30 ^{P2+3}	182,57 \pm 211,60 ^{B,P2+3,P10+12+13}	378,80 \pm 140,30 ^{*,B,O,P10+12+13}	760,70 \pm 356,50 ^{*,B,O,P10+12+13}	154,49 \pm 212,60 ^{P2+3}	47,56 \pm 55,30 ^{B,O,P2+3}
Grupo 2: Sujetos asintomáticos (n=7)	⁵ 19,85 \pm 27,77 ^{P2+3}	12,04 \pm 2,48	7,28 \pm 6,48 ^{P2+3}	2,29 \pm 3,06	723,65 \pm 834,01 ^{B,O,P10+12+13}	184,65 \pm 307,81	4,70 \pm 2,820 ^{*,P2+3}	1,83 \pm 1,64 [*]
Grupo 3: Sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo (n=15)	^{1,5} 18,84 \pm 15,22 ^{*,O,P2+3}	¹ 3,69 \pm 4,21 ^{*,O,P2+3,P10+12+13}	55,11 \pm 49,66 ^{*,B,P2+3}	58,52 \pm 45,76 ^{B,P2+3}	1.446,60 \pm 728,12 ^{*,B,O,P10+12+13}	619,05 \pm 493,69 ^{*,B,O,P10+12+13}	38,71 \pm 37,95 ^{P2+3}	107,88 \pm 145,36 ^{B,P2+3}
Grupo 4: Sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento (n=15)	⁵ 35,16 \pm 38,60 ^{*,O,P2+3,P10+12+13}	¹ 3,56 \pm 3,67 ^{*,O,P2+3}	104,47 \pm 62,73 ^{B,P2+3}	256,27 \pm 363,20 ^{B,P10+12+13}	1.083,30 \pm 548,69 ^{*,B,O,P10+12+13}	399,64 \pm 495,90 ^{*,B,P10+12+13}	207,92 \pm 227,56 ^{*,B,P2+3}	2,78 \pm 2,86 ^{*,O,P2+3}
Grupo 5: Sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con AIT (n=12)	^{1,2,3,4} 2,31 \pm 2,17 ^{O,P2+3,P10+12+13}	¹ 2,40 \pm 1,50 ^{O,P2+3,P10+12+13}	24,09 \pm 27,48 ^{B,P2+3}	37,15 \pm 32,69 ^{B,P2+3}	830,35 \pm 678,41 ^{B,O,P10+12+13}	453,54 \pm 76,28 ^{B,O,P10+12+13}	15,52 \pm 12,02 ^{B,P2+3}	18,69 \pm 26,10 ^{B,P2+3}

Los números situados a la izquierda indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos, a nivel basal, dentro del mismo periodo. 1: Grupo 1, 2: Grupo 2, 3: Grupo 3, 4: Grupo 4, 5: Grupo 5. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los dos periodos analizados. Los símbolos situados a la derecha, indican frente a qué muestra, dentro del mismo periodo y grupo de estudio, hay diferencias significativas. B: Basal, O: Olea, 2+3: Péptidos 2+3, 10+12+13: Péptidos 10+12+13.

E) Niveles medios de citocinas Treg.

E.1. IL-10 (pg/ml).

Grupo clínico	Basal		Olea		Péptido 2+3		Péptido 10+12+13	
	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización
Grupo 1: Sujetos no alérgicos (n=15)	⁵ 2,22 ± 1,28 ^{O,P2+3}	^{3,5} 1,68 ± 0,47 ^{O,P2+3,P10+12+13}	3,49 ± 1,95 ^{*,B,P2+3,P10+12+13}	8,85 ± 9,01 ^{*,B,P2+3,P10+12+13}	20,53 ± 6,21 ^{*,B,O,P10+12+13}	26,17 ± 6,82 ^{*,B,O,P10+12+13}	2,27 ± 0,67 ^{O,P2+3}	1,94 ± 0,18 ^{B,O,P2+3}
Grupo 2: Sujetos asintomáticos (n=7)	⁵ 2,45 ± 1,41 ²⁺³	^{3,5} 1,33 ± 1,18	2,19 ± 1,37 ^{P2+3}	1,24 ± 1,09	55,79 ± 50,82 ^{*,B,O,P10+12+13}	8,23 ± 13,25 [*]	1,45 ± 0,65 ^{P2+3}	1,06 ± 0,30
Grupo 3: Sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo (n=15)	⁵ 1,86 ± 2,14 ^{*,O,P2+3,P10+12+13}	^{1,2} 4,038 ± 0,30 ^{*,O,P2+3,P10+12+13}	6,06 ± 4,70 ^{*,B,P2+3,P10+12+13}	30,53 ± 28,42 ^{*,B,P10+12+13}	116,81 ± 65,01 ^{*,B,O,P10+12+13}	30,97 ± 25,94 ^{*,B,P10+12+13}	2,67 ± 2,12 ^{B,O,P2+3}	2,17 ± 1,44 ^{B,O,P2+3}
Grupo 4: Sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento (n=15)	⁵ 4,51 ± 6,00 ^{P2+3}	^{3,5} 2,58 ± 3,83 ^O	6,71 ± 4,77 ^{*,P2+3}	38,32 ± 44,25 ^{*,B,P2+3,P10+12+13}	52,79 ± 18,19 ^{*,B,O,P10+12+13}	6,25 ± 7,10 ^{*,O,P10+12+13}	4,57 ± 2,46 ^{*,P2+3}	0,87 ± 1,52 ^{*,O,P2+3}
Grupo 5: Sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con AIT (n=12)	^{1,2,3,4} 0,35 ± 0,61 ^{P2+3,P10+12+13}	^{1,2} 4,016 ± 0,28 ^{O,P2+3}	1,71 ± 2,96 ^{*,P2+3}	23,24 ± 29,26 ^{*,B,P10+12+13}	65,95 ± 84,62 ^{*,B,O,P10+12+13}	21,48 ± 7,32 ^{B,P10+12+13}	1,76 ± 0,85 ^{B,P2+3}	0,93 ± 1,61 ^{O,P2+3}

Los números situados a la izquierda indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos, a nivel basal, dentro del mismo periodo. 1: Grupo 1, 2: Grupo 2, 3: Grupo 3, 4: Grupo 4, 5: Grupo 5. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los dos periodos analizados. Los símbolos situados a la derecha, indican frente a qué muestra, dentro del mismo periodo y grupo de estudio, hay diferencias significativas. B: Basal, O: Olea, 2+3: Péptidos 2+3, 10+12+13: Péptidos 10+12+13.

E.2. TGF- β (pg/ml).

Grupo clínico	Basal		Olea		Péptido 2+3		Péptido 10+12+13	
	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización	Durante la polinización	Fuera de la polinización
Grupo 1: Sujetos no alérgicos (n=15)	^{2,5} 194,43 \pm 88,91	^{2,4,5} 163,89 \pm 103,70 ^{O,P2+3,P10+12+13}	163,48 \pm 141,81*	77,06 \pm 56,49* ^{B,P2+3,P10+12+13}	156,86 \pm 100,80*	5,92 \pm 9,15* ^{B,O,P10+12+13}	174,52 \pm 86,55*	30,37 \pm 26,72* ^{B,O,P2+3}
Grupo 2: Sujetos asintomáticos (n=7)	^{1,4} 512,80 \pm 550,05*	^{1,3,5} 1,93 \pm 3,34*	319,64 \pm 378,42	0,00 \pm 0,00	406,41 \pm 497,28	0,00 \pm 0,00	195,99 \pm 339,47	80,17 \pm 170,06
Grupo 3: Sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo (n=15)	283,42 \pm 374,40	^{2,4} 242,22 \pm 213,17	234,31 \pm 278,96	180,90 \pm 179,08	143,24 \pm 207,05	174,14 \pm 176,59	159,62 \pm 195,27	152,51 \pm 154,64
Grupo 4: Sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento (n=15)	^{2,5} 133,24 \pm 230,77	^{1,3,5} 78,16 \pm 102,81	102,00 \pm 173,03	49,72 \pm 86,12	126,98 \pm 182,83	30,32 \pm 26,32	117,93 \pm 165,96	56,70 \pm 98,20
Grupo 5: Sujetos alérgicos al polen de olivo con AIT (n=12)	^{1,4} 317,96 \pm 189,61 ^{P10+12+13}	^{1,2,4} 347,34 \pm 226,03	246,70 \pm 171,74	197,22 \pm 206,61	216,00 \pm 180,00	181,89 \pm 181,97	160,95 \pm 132,13 ^B	131,47 \pm 114,80

Los números situados a la izquierda indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos, a nivel basal, dentro del mismo periodo. 1: Grupo 1, 2: Grupo 2, 3: Grupo 3, 4: Grupo 4, 5: Grupo 5. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los dos periodos analizados. Los símbolos situados a la derecha, indican frente a qué muestra, dentro del mismo periodo y grupo de estudio, hay diferencias significativas. B: Basal, O: Olea, 2+3: Péptidos 2+3, 10+12+13: Péptidos 10+12+13.

3.2 ANÁLISIS DE SECRECIÓN DE CITOCINAS ENTRE LOS GRUPOS DE SUJETOS NO ALÉRGICOS Y LOS SUJETOS ALÉRGICOS AL POLEN DE OLIVO SIN TRATAMIENTO

La Tabla 21 y las Figuras 15 y 16 resumen los niveles medios de citocinas obtenidos en estos dos grupos clínicos, expresados en forma de promedio de los *pools* de muestras analizadas \pm desviación estándar (las unidades de cuantificación vienen expresadas en pg/ml). En ellas, se señalan las diferencias estadísticamente significativas para cada una de las comparaciones establecidas.

Se separan por apartados las citocinas reguladoras de todas las demás, por ser las que presentaron los resultados más interesantes y relevantes, debido a sus implicaciones funcionales.

3.2.1 Niveles de IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-13 y TNF- α

La Tabla 21 resume los niveles medios de IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-13 y TNF- α detectados en cada condición experimental, señalando las diferencias de secreción estadísticamente significativas entre los dos grupos clínicos, para un mismo periodo de exposición al alérgeno.

Los niveles de secreción de IL-2 fueron mayores en el grupo de los sujetos no alérgicos que en el grupo de los pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento, tanto fuera como durante el periodo de polinización para todas las condiciones experimentales planteadas, aunque no en todos los casos las diferencias fueron estadísticamente significativas (Tabla 21). Este mismo comportamiento se observa con el IFN- γ , a excepción de lo que ocurre basalmente fuera del periodo de polinización, donde la expresión es mayor en los sujetos alérgicos sin tratamiento ($3,32 \pm 4,71$ pg/ml) que en los no alérgicos ($2,21 \pm 1,54$ pg/ml), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En cuanto a la secreción de citocinas de perfil Th2, los niveles de expresión de IL-4 e IL-5 fueron muy bajos y, en la mayoría de las condiciones experimentales, superiores en los sujetos no alérgicos que en los alérgicos. Respecto a la IL-13, en todos los casos los niveles fueron indetectables, excepto en los sujetos alérgicos estimulados con Olea y el Péptido 10+12+13, fuera del periodo de polinización, que mostraron niveles muy bajos (Olea: $0,59 \pm 0,18$ pg/ml; Péptido 10+12+13: $0,39 \pm 0,78$ pg/ml).

En lo referente al TNF- α , a nivel Basal, son los sujetos no alérgicos los que presentan mayores niveles de secreción en comparación con los alérgicos, tanto durante como fuera del periodo de

polinización. No obstante, cuando se estimulan las células con Olea, el Péptido 2+3 y el Péptido 10+12+13 son los sujetos alérgicos los que mayores niveles de TNF- α secretan tanto durante como fuera del periodo de polinización (a excepción de lo que ocurre con el Péptido 2+3 y el Péptido 10+12+13 fuera del periodo de polinización) (Tabla 21).

Tabla 21. Niveles medios de citocinas IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α .

Citocina	Periodo	Basal		Olea		Péptido 2+3		Péptido 10+12+13		
		Sujetos no alérgicos	Sujetos alérgicos sin tratamiento	Sujetos no alérgicos	Sujetos alérgicos sin tratamiento	Sujetos no alérgicos	Sujetos alérgicos sin tratamiento	Sujetos no alérgicos	Sujetos alérgicos sin tratamiento	
IL- 2	Durante	1,31 \pm 1,22*	0,20 \pm 0,35*	0,83 \pm 0,82	0,53 \pm 0,91	1,44 \pm 1,31	0,00 \pm 0,00	1,82 \pm 1,73*	0,70 \pm 0,64*	
	Fuera	2,78 \pm 2,41	1,48 \pm 1,85	2,30 \pm 2,00*	0,55 \pm 1,09*	2,73 \pm 2,37*	0,20 \pm 0,41*	3,00 \pm 1,52*	0,36 \pm 0,73*	
Th1 IFN- γ	Durante	1,49 \pm 0,83	0,00 \pm 0,00	1,21 \pm 1,04*	0,35 \pm 0,61*	1,45 \pm 1,03	1,06 \pm 1,83	1,32 \pm 1,01*	0,56 \pm 0,97*	
	Fuera	2,21 \pm 1,54	3,32 \pm 4,71	2,70 \pm 1,62*	1,08 \pm 1,24*	2,78 \pm 2,14	0,00 \pm 0,00	2,20 \pm 1,66	0,00 \pm 0,00	
Th2	IL-4	Durante	1,32 \pm 0,60	0,00 \pm 0,00	1,44 \pm 0,53*	0,39 \pm 0,67*	2,02 \pm 0,67	1,50 \pm 1,40	0,97 \pm 0,26*	0,24 \pm 0,41*
		Fuera	1,44 \pm 0,48*	0,66 \pm 0,76*	2,13 \pm 1,17*	1,11 \pm 1,03*	2,71 \pm 0,98*	0,78 \pm 0,97*	1,33 \pm 0,63	0,00 \pm 0,00
	IL-5	Durante	0,46 \pm 0,14	0,00 \pm 0,00	0,41 \pm 0,23*	0,07 \pm 0,12*	0,36 \pm 0,15	0,00 \pm 0,00	0,40 \pm 0,04	0,00 \pm 0,00
		Fuera	0,26 \pm 0,26	0,32 \pm 0,63	0,64 \pm 0,04	0,46 \pm 0,68	0,24 \pm 0,03	0,00 \pm 0,00	0,29 \pm 0,26	0,00 \pm 0,00
	IL-13	Durante	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
		Fuera	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,59 \pm 1,18	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,39 \pm 0,78
TNF- α	Durante	55,08 \pm 64,80	35,16 \pm 38,60	99,67 \pm 115,30	104,47 \pm 62,73	378,80 \pm 140,30*	1083,30 \pm 548,69*	154,49 \pm 212,60	207,92 \pm 227,56	
	Fuera	6,61 \pm 1,61*	3,56 \pm 3,67*	182,57 \pm 211,60	256,27 \pm 363,20	760,70 \pm 356,50*	399,64 \pm 495,90*	47,56 \pm 55,30*	2,78 \pm 2,86*	

Unidades expresadas en pg/ml. Se señalan con * las diferencias de secreción estadísticamente significativas entre los dos grupos clínicos para cada periodo de exposición al alérgeno y condición experimental planteada.

3.2.2 Niveles de citocinas reguladoras

Los resultados más relevantes se obtuvieron en los niveles de secreción de las citocinas reguladoras: IL-10 (Figura 15) y TGF- β (Figura16).

3.2.2.1 Niveles de IL-10

Como se comprueba en la Figura 15, en la condición Basal no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de secreción de IL-10 entre ambos grupos. Sin embargo, sí fueron diferenciales con el resto de los estímulos. Ante la estimulación con el extracto completo de polen de olivo (Olea), los sujetos alérgicos presentaron niveles de secreción más elevados ($6,71 \pm 4,77$ pg/ml durante y $38,32 \pm 44,25$ pg/ml fuera) que el grupo de los sujetos no alérgicos ($3,49 \pm 1,95$ pg/ml durante y $8,85 \pm 9,01$ pg/ml fuera), siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, con las estimulaciones con los Péptidos 2+3 y 10+12+13 obtuvimos resultados similares entre sí. En ambos casos, durante el periodo de polinización, son los pacientes alérgicos los que secretan mayores niveles de IL-10 (Péptido 2+3: $52,79 \pm 18,19$ pg/ml; Péptido 10+12+13: $4,57 \pm 2,46$ pg/ml) en comparación con los sujetos no alérgicos (Péptido 2+3: $20,53 \pm 6,21$ pg/ml; Péptido 10+12+13: $2,27 \pm 0,67$ pg/ml). No obstante, fuera del periodo, esta relación se revierte, siendo los sujetos no alérgicos los que secretan los niveles más elevados (Péptido 2+3: $26,17 \pm 6,82$ pg/ml; Péptido 10+12+13: $1,94 \pm 0,18$ pg/ml) en comparación con lo que sucede con los sujetos alérgicos al polen de olivo (Péptido 2+3: $6,25 \pm 7,10$ pg/ml; Péptido 10+12+13: $0,87 \pm 1,52$ pg/ml).

3.2.2.2 Niveles de TGF- β

Respecto al TGF- β , solamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, en las muestras recogidas fuera del periodo de polinización para la condición Basal ($163,89 \pm 103,70$ pg/ml en los individuos no alérgicos frente a los $78,16 \pm 102,81$ pg/ml obtenidos en los sujetos alérgicos) y tras estimular con el Péptido 2+3. En este segundo caso, los pacientes alérgicos secretan mayores niveles ($30,32 \pm 26,32$ pg/ml) que los sujetos no alérgicos ($5,92 \pm 9,15$ pg/ml) (Figura 16).

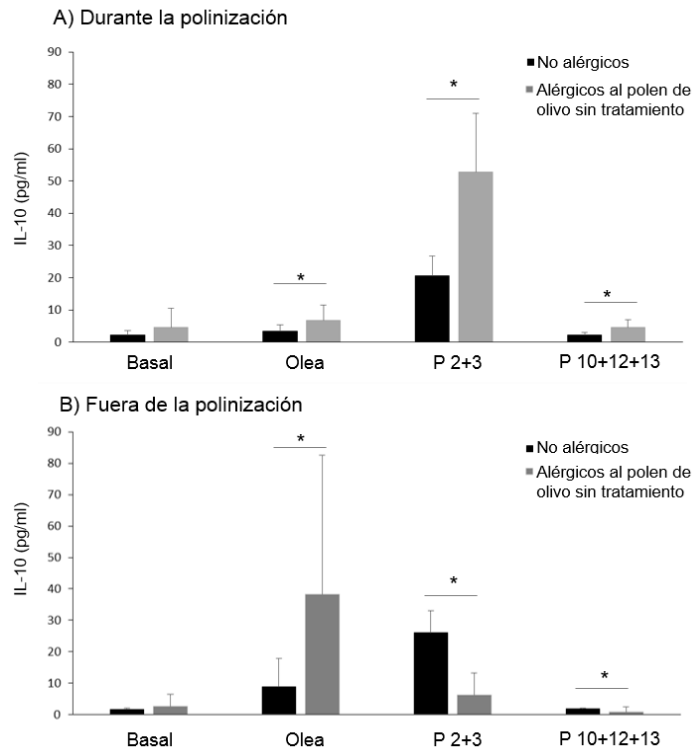


Figura 15. Niveles de secreción de IL-10. A) Durante la polinización B) Fuera de la polinización. * Diferencias de secreción estadísticamente significativas entre los grupos para la misma condición experimental y periodo de recogida de las muestras.

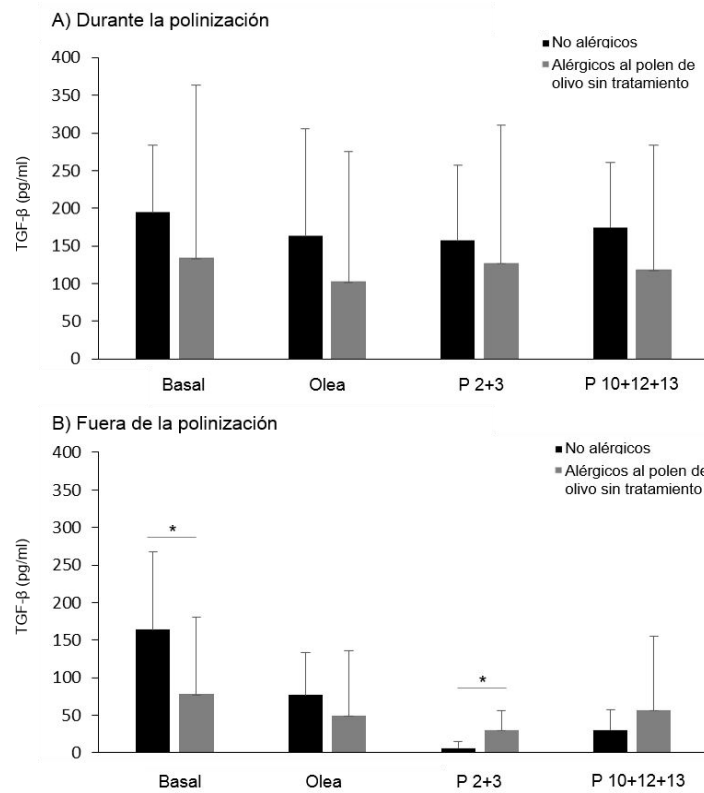


Figura 16. Niveles de secreción de TGF-β. A) Durante la polinización B) Fuera de la polinización. * Diferencias de secreción estadísticamente significativas entre los grupos para la misma condición experimental y periodo de recogida de las muestras.

Con la finalidad de evaluar los cambios de secreción de citocinas debido a los estímulos, en el grupo de los sujetos alérgicos al polen de olivo, se realizaron comparaciones entre las distintas condiciones experimentales y periodos de exposición al alérgeno en este grupo de sujetos. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 22 y en las Figuras 17 y 18.

3.3 ANÁLISIS DE SECRECIÓN DE CITOCINAS EN EL GRUPO DE SUJETOS ALÉRGICOS AL POLEN DE OLIVO SIN TRATAMIENTO

Para realizar este análisis, se realizaron dos tipos de comparaciones:

3.3.1 Comparaciones entre las distintas condiciones experimentales para un mismo periodo de exposición al alérgeno, evaluando así, los cambios inducidos por los estímulos.

3.3.2 Comparaciones entre los dos periodos de exposición al antígeno para cada una de las condiciones experimentales, con el fin de evaluar si el comportamiento de los estímulos depende de la carga antigénica ambiental.

3.3.1 Comparaciones entre las distintas condiciones experimentales para un mismo periodo de exposición al alérgeno

3.3.1.1 Niveles de IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-13 y TNF- α

En la Tabla 22 se resumen todas las comparaciones realizadas para estas citocinas.

Los niveles de IL-2 secretados por las PBMC fueron muy bajos. Durante el periodo de polinización, los niveles más altos se encontraron en la estimulación con el Péptido 10+12+13 ($0,70 \pm 0,64$ pg/ml), siendo significativamente superiores a los encontrados en la condición Basal ($0,20 \pm 0,35$ pg/ml). Fuera del periodo de polinización, los mayores niveles se secretaron en la condición Basal ($1,48 \pm 1,85$ pg/ml), siendo estadísticamente superiores a los encontrados con el Péptido 2+3 ($0,20 \pm 0,41$ pg/ml).

La secreción de IFN- γ no parece estar controlada por los estímulos, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas condiciones experimentales, ni en las muestras recogidas durante ni fuera del periodo de polinización.

Respecto a las citocinas de perfil Th2, durante el periodo de polinización, los niveles de secreción de IL-4 más elevados se encontraron en la estimulación con el Péptido 2+3 ($1,50 \pm 1,40$ pg/ml)

siendo significativamente superiores a los encontrados en la condición Olea ($0,39 \pm 0,67$ pg/ml) y Péptido 10+12+13 ($0,24 \pm 0,41$ pg/ml). Fuera de este periodo, no encontramos diferencias estadísticamente relevantes en los niveles de esta citocina, como tampoco encontramos diferencias en las comparaciones para la IL-5 e IL-13, ni durante ni fuera del periodo de polinización.

Las mayores diferencias de secreción entre las condiciones experimentales (tanto durante como fuera del periodo de polinización) las encontramos en el estudio del TNF- α . Los niveles más altos de secreción se obtuvieron con la estimulación Péptido 2+3 (durante la polinización: $1.083,30 \pm 548,69$ pg/ml; fuera de la polinización: $399,64 \pm 495,90$ pg/ml). Durante el periodo de polinización, los niveles más bajos se obtuvieron en la condición Basal ($35,16 \pm 38,60$ pg/ml) mientras que fuera del periodo, fue la condición Péptido 10+12+13 la que presentó los menores niveles ($2,78 \pm 2,86$ pg/ml).

3.3.1.2 Niveles de citocinas reguladoras

3.3.1.2.1 Niveles de IL-10

En relación a las condiciones experimentales, como muestra la Figura 17, los niveles de secreción de IL-10 son distintos en función del momento de la recogida de las muestras. Durante el periodo de polinización, los niveles de secreción más elevados se encontraron cuando se estimularon las células con el Péptido 2+3 ($52,79 \pm 18,19$ pg/ml), siendo estos niveles estadísticamente mayores que los encontrados a nivel Basal ($4,51 \pm 6,00$ pg/ml), tras estimular con Olea ($6,71 \pm 4,77$ pg/ml) y con el Péptido 10+12+13 ($4,57 \pm 2,46$ pg/ml). Sin embargo, fuera de la estación polínica, son las muestras estimuladas con Olea las que indujeron los mayores niveles de secreción ($38,32 \pm 44,25$ pg/ml), siendo estos niveles estadísticamente superiores que los encontrados a nivel Basal ($2,58 \pm 3,83$ pg/ml), con el Péptido 2+3 ($6,25 \pm 7,10$ pg/ml) y con el Péptido 10+12+13 ($0,87 \pm 1,52$ pg/ml). En este mismo periodo, los niveles de IL-10 tras la estimulación con el Péptido 2+3 también fueron estadísticamente superiores ($6,25 \pm 7,10$ pg/ml) a los encontrados con el Péptido 10+12+13 ($0,87 \pm 1,52$ pg/ml).

3.3.1.2.2 Niveles de TGF- β

Los estímulos utilizados no parecen influir significativamente en la expresión de esta citocina (Figura 18), puesto que no hay ninguna diferencia estadísticamente significativa. Durante el periodo de polinización son las muestras sin estimular las que muestran mayores niveles ($133,24 \pm 230,70$ pg/ml) seguido de las muestras estimuladas con el Péptido 2+3 ($126,98 \pm 182,83$ pg/ml), mientras que la menor secreción se produce con el estímulo Olea ($102,00 \pm 173,03$ pg/ml). Fuera del periodo, los niveles más elevados se encontraron en las células sin estimular ($78,16 \pm 102,81$ pg/ml),

mientras que los niveles más bajos se encontraron tras estimularlas con el Péptido 2+3 ($30,32 \pm 26,32$ pg/ml).

3.3.2 Comparaciones entre los dos periodos de exposición al antígeno para cada una de las condiciones experimentales

3.3.2.1 Niveles de IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 y TNF- α

En relación a estas citocinas, el periodo de recogida de las muestras no parece intervenir de una manera importante en las condiciones experimentales planteadas (Tabla 22), ya que solo alguna de las citocinas se ve influenciada por este hecho: IL-2 a nivel Basal (durante: $0,20 \pm 0,35$ pg/ml; fuera: $1,48 \pm 1,85$ pg/ml), IL-4 e IL-5 en la condición Olea (IL-4 durante: $0,39 \pm 0,67$ pg/ml, fuera: $1,11 \pm 1,03$ pg/ml; IL-5 durante: $0,07 \pm 0,12$ pg/ml, fuera: $0,46 \pm 0,68$ pg/ml) y TNF- α en las condiciones Basal (durante: $35,16 \pm 38,60$ pg/ml; fuera: $3,56 \pm 3,67$ pg/ml), Péptido 2+3 (durante: $1083,30 \pm 548,69$ pg/ml; fuera: $399,64 \pm 495,90$ pg/ml) y Péptido 10+12+13 (durante: $207,92 \pm 227,56$ pg/ml; fuera: $2,78 \pm 2,86$ pg/ml).

3.3.2.2 Niveles de citocinas reguladoras

3.3.2.2.1 Niveles de IL-10

El periodo de polinización parece influir en los resultados de secreción de IL-10 de forma diferente dependiendo del estímulo (Figura 17). Cuando se estimulan con Olea (extracto completo) las células obtenidas fuera del periodo de polinización, los niveles secretados de IL-10 son mayores ($38,32 \pm 44,25$ pg/ml) que los encontrados en las células estimuladas durante la estación polínica ($6,71 \pm 4,77$ pg/ml), siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, la estimulación con los péptidos, induce justo el efecto contrario: el Péptido 2+3 induce mayor secreción de IL-10 durante el periodo de polinización ($52,79 \pm 18,19$ pg/ml) que fuera del mismo ($6,25 \pm 7,10$ pg/ml), al igual que el Péptido 10+12+13 ($4,57 \pm 2,46$ pg/ml durante el periodo de polinización vs $0,87 \pm 1,52$ pg/ml fuera).

3.3.2.2.2 Niveles de TGF- β

Aunque los niveles medios de TGF- β no mostraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las condiciones experimentales estudiadas, en función del periodo de recogida de las muestras, siempre se encontraron los niveles mayores de secreción durante el periodo de polinización (Figura 18).

Tabla 22. Niveles medios de citocinas IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α en el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.

Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento						
Citocina	Periodo	Condición experimental				
		Basal	Olea	Péptido 2+3	Péptido 10+12+13	
IL- 2	Durante	*0,20 \pm 0,35 ^{P10+12+13}	0,53 \pm 0,91	0,00 \pm 0,00	0,70 \pm 0,64 ^B	
	Fuera	*1,48 \pm 1,85 ^{P2+3}	0,55 \pm 1,09	0,20 \pm 0,41 ^B	0,36 \pm 0,73	
Th1	IFN- γ	Durante	0,00 \pm 0,00	0,35 \pm 0,61*	1,06 \pm 1,83	0,56 \pm 0,97
		Fuera	3,32 \pm 4,71	1,08 \pm 1,24*	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Th2	IL-4	Durante	0,00 \pm 0,00	*0,39 \pm 0,67 ^{P2+3}	1,50 \pm 1,40 ^{O,P10+12+13}	0,24 \pm 0,41 ^{P2+3}
		Fuera	0,66 \pm 0,76	*1,11 \pm 1,03	0,78 \pm 0,97	0,00 \pm 0,00
	IL-5	Durante	0,00 \pm 0,00	*0,07 \pm 0,12	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
		Fuera	0,32 \pm 0,63	*0,46 \pm 0,68	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	IL-13	Durante	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
		Fuera	0,00 \pm 0,00	0,59 \pm 1,18	0,00 \pm 0,00	0,39 \pm 0,78
TNF- α	Durante	*35,16 \pm 38,60 ^{O,P2+3,P10+12+13}	104,47 \pm 62,73 ^{B,P2+3}	*1083,30 \pm 548,69 ^{B,O,P10+12+13}	*207,92 \pm 227,56 ^{B,P2+3}	
	Fuera	*3,56 \pm 3,67 ^{O,P2+3}	256,27 \pm 363,20 ^{B,P10+12+13}	*399,64 \pm 495,90 ^{B,P10+12+13}	*2,78 \pm 2,86 ^{O,P2+3}	

Unidades expresadas en pg/ml. *Diferencias estadísticamente significativas en los niveles de secreción entre los dos momentos de exposición al alérgeno (durante vs fuera del periodo de polinización). B (Basal), O (Olea), P2+3 (Péptido 2+3), P10+12+13 (Péptido 10+12+13) Diferencias de expresión estadísticamente significativas entre las distintas condiciones experimentales en cada periodo de exposición al alérgeno.

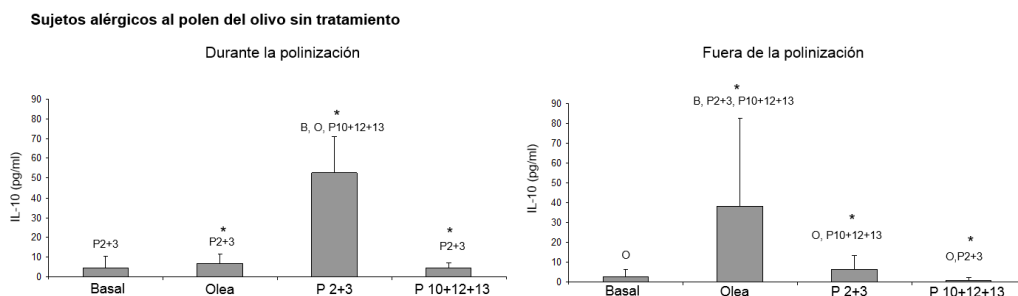


Figura 17. Niveles de secreción de IL-10 en los sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.

*Diferencias estadísticamente significativas entre los dos periodos de exposición al alérgeno para cada una de las condiciones experimentales planteadas. B (Basal), O (Olea), P2+3 (Péptido 2+3), P10+12+13 (Péptido 10+12+13) Diferencias de expresión estadísticamente significativas entre las distintas condiciones experimentales planteadas para cada periodo de exposición al alérgeno.

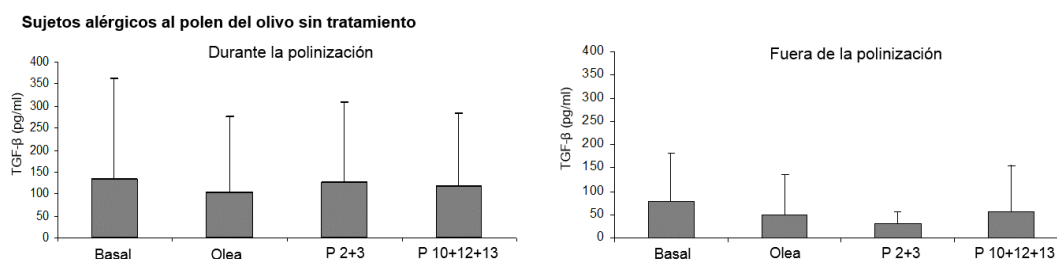


Figura 18. Niveles de secreción de TGF- β en los sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.

*Diferencias estadísticamente significativas entre los dos periodos de exposición al alérgeno para cada una de

las condiciones experimentales planteadas. B (Basal), O (Olea), P2+3 (Péptido 2+3), P10+12+13 (Péptido 10+12+13) Diferencias de expresión estadísticamente significativas entre las distintas condiciones experimentales planteadas para cada periodo de exposición al alérgeno.

4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MASIVA MEDIANTE MICROARRAYS

Para realizar este estudio se utilizó el *microarray* de expresión génica en humanos "HGU133 plus 2.0" de Affymetrix, el cual permite el estudio de 46.010 transcritos, que engloban todo el genoma humano, tal y como se detalla en el Apartado 7 de Materiales y Métodos.

4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

En este estudio se seleccionaron 6 individuos de cada uno de los grupos clínicos establecidos, a excepción del grupo de sujetos asintomáticos en el que se estudiaron 3 (tal y como se expone en las Tablas 4 y 5 del Apartado 7.2 de Materiales y Métodos). Las características demográficas y clínicas de esta población se indican en la Tabla 23.

Tabla 23. Características demográficas y clínicas de los sujetos seleccionados para el análisis de *microarrays*.

Grupo clínico	N	Media edad (años)	Sexo % mujer/hombre	Durante la polinización		Fuera de la polinización		Diagnóstico clínico
				IgE Total (UI/ml)	IgE específica (kUA/l)	IgE Total (UI/ml)	IgE específica (kUA/l)	
Grupo 1: Sujetos no alérgicos	6	35±10	50/50	42,27 ± 41,68 ⁴	0,30 ± 0,00 ⁴	39,62 ± 38,98 ⁴	0,30 ± 0,00 ⁴	Sanos
Grupo 2: Sujetos asintomáticos*	3	32±10	50/50	214,4 ± 234,77	1,48 ± 1,36 ⁴	290,00 ± 310,00	2,83 ± 3,20 ⁴	Subclínicos
Grupo 3: Sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo	6	27±16	50/50	121,72 ± 95,33	0,31 ± 0,04 ⁴	141,58 ± 106,20	0,58 ± 0,53 ⁴	16,6% Anafilaxia 16,6% Reacción a picadura de insecto 33,3% Asma/Rinitis 33,3% Rinitis
Grupo 4: Sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento	6	33±11	83/17	162,67 ± 48,97 ¹	20,09 ± 10,91 ^{1,2,3}	203,83 ± 84,37 ¹	50,62 ± 36,38 ^{1,2,3}	100% Asma/Rinitis
Grupo 5: Sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con AIT	6	28±7	83/17	527,16 ± 756,35	30,40 ± 41,05	534,56 ± 607,95	38,846 ± 39,56	75% Asma/Rinitis** 25% Rinitis

* Pruebas cutáneas positivas al extracto de *Olea europaea*, pero sin síntomas clínicos. ** Manifestaciones clínicas observadas antes de empezar con el tratamiento con AIT. ^{1, 2, 3, 4} Diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) respecto a los grupos 1, 2, 3 y 4.

Una vez realizados los ensayos de estimulación, se extrajeron un total de 216 muestras de RNA que procedían del cultivo de 1.10^6 PBMC para cada una de las cuatro condiciones experimentales planteadas (ausencia/presencia de los distintos estímulos), de cada uno de los 27 sujetos participantes en el estudio, para cada periodo de exposición al alérgeno: 4 condiciones

experimentales (ausencia/presencia de los distintos estímulos) por cada sujeto x 27 sujetos de estudio (6 de cada grupo clínico a excepción del grupo de asintomáticos) x 2 periodos de exposición= 216 muestras (Tabla 5, Apartado 7.2 de Materiales y Métodos).

Las muestras se agruparon por *pools* de dos muestras de RNA (relación 1:1), a excepción del grupo de sujetos asintomáticos, para su análisis de expresión génica por *microarrays* (Tabla 4, Apartado 7.2 de Materiales y Métodos). En total se estudiaron 120 muestras/*pools*. La concentración aproximada de cada muestra de RNA o *pool* fue de 80 ng/ μ l.

4.2 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA GLOBAL

Una vez comprobada la calidad de los *microarrays* y, con el objetivo de analizar las distintas fuentes de variación frente al error, se realizó el test estadístico ANOVA, con una corrección para modelos multivariantes (FDR: *False Discovery Rate*), con un umbral del 5%. Como se puede comprobar en la Figura 19, a nivel global, el factor que más variabilidad aporta al sistema es la fecha de escaneado, seguido del grupo clínico, del estímulo y por último, del periodo de exposición en el que se recogieron las muestras.

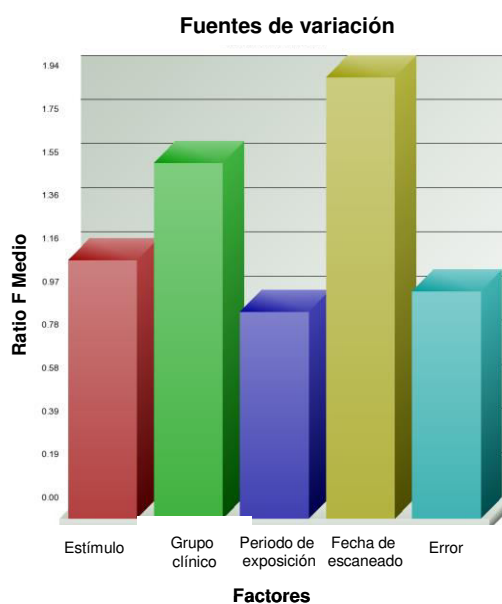


Figura 19. Análisis por ANOVA de fuentes de variación en el estudio.

En los estudios de *microarrays*, se producen los llamados *batch effects*: fuentes de variación que proceden del manipulado de las muestras, en gran medida por el hecho de que el estudio de estas dura varios días y que los lotes de los chips utilizados son distintos. En nuestro caso, el *batch effect* viene representado en la Figura 19 como fecha de escaneado, por eso, para eliminarlo de las visualizaciones utilizamos el *Batch Removal Effect* (BRE). Tras esta corrección, la fuente que más

variabilidad aporta al sistema es el grupo clínico al que pertenece una determinada muestra, seguido del estímulo al que ha sido sometida, mientras que el periodo de exposición polínica, a nivel global, aporta la menor variabilidad (Figura 20).

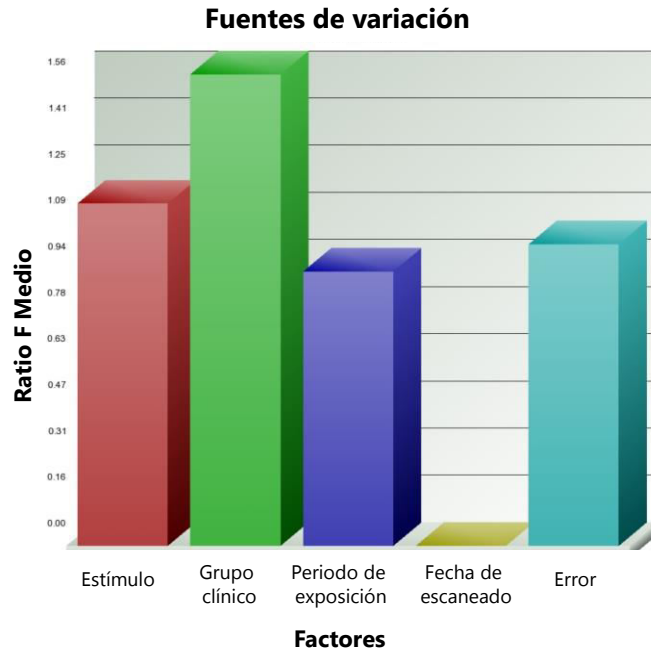


Figura 20. Análisis de fuentes de variación, eliminando la fecha de escaneado.

Tras aplicar filtros al ANOVA, en función de los dos parámetros que aportan la mayor variabilidad al sistema (grupo clínico y estímulo), se identificaron un total de 1.746 sondas génicas diferencialmente expresadas entre los distintos grupos así como, un total de 563 sondas, diferencialmente expresadas en función del estímulo recibido. Cuarenta y cinco son comunes a las dos fuentes de variación (Figura 21).

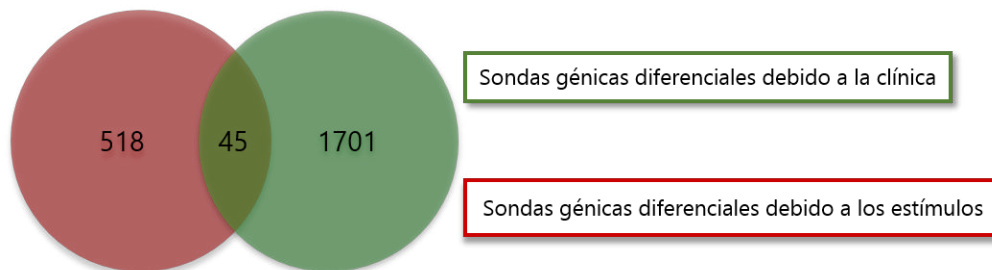


Figura 21. Número de sondas génicas diferencialmente expresadas debido a la condición clínica de los sujetos de estudio y debido a los estímulos recibidos.

Posteriormente, se realizaron múltiples estudios de análisis de componentes principales (PCA). Por un lado, se incluyeron en el estudio solo las muestras sin estimular (condición Basal). En este

análisis, se comprobó que la expresión total de las sondas génicas, define 5 agrupaciones que corresponden con los 5 grupos clínicos previamente establecidos, como se puede comprobar en la Figura 22 (no se observó un agrupamiento claro de las muestras en función del momento de recogida de las mismas). Por otro, se realizó un PCA global con todas las muestras participantes en el estudio, como muestra la Figura 23. En este caso, la expresión total de las sondas génicas permite agrupar a las muestras en dos grupos: las que han sido estimuladas con el Péptido 2+3 por un lado y, todas las demás por otro, sin atender ni al grupo clínico ni al periodo de recogida de las muestras (durante o fuera del periodo de polinización).

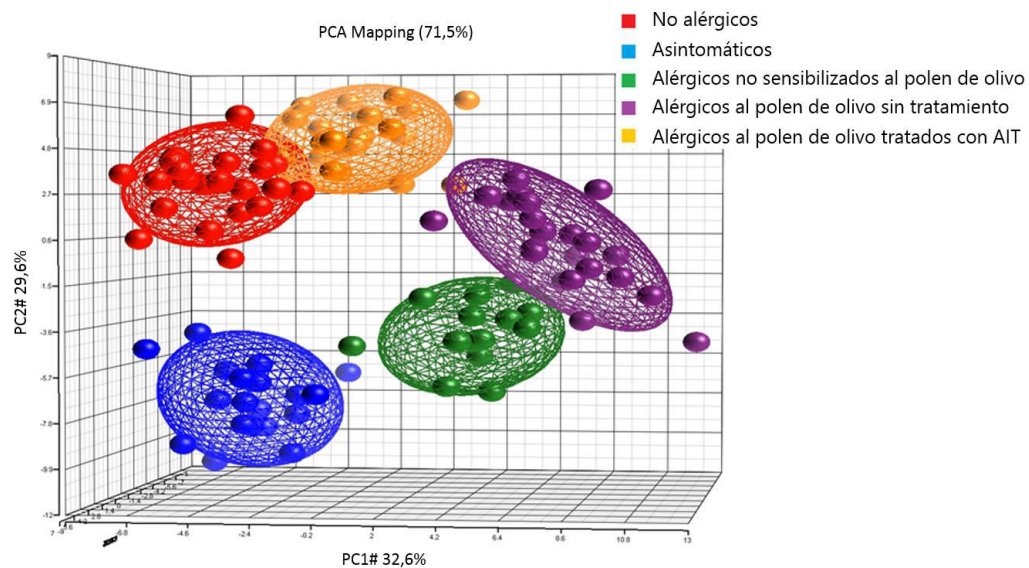


Figura 22. Análisis por PCA de las muestras sin estimular. En la figura se indica la correcta separación de las muestras sin estimular en función del grupo clínico al que pertenecen (Aguerri M. *et al.*, 2013).

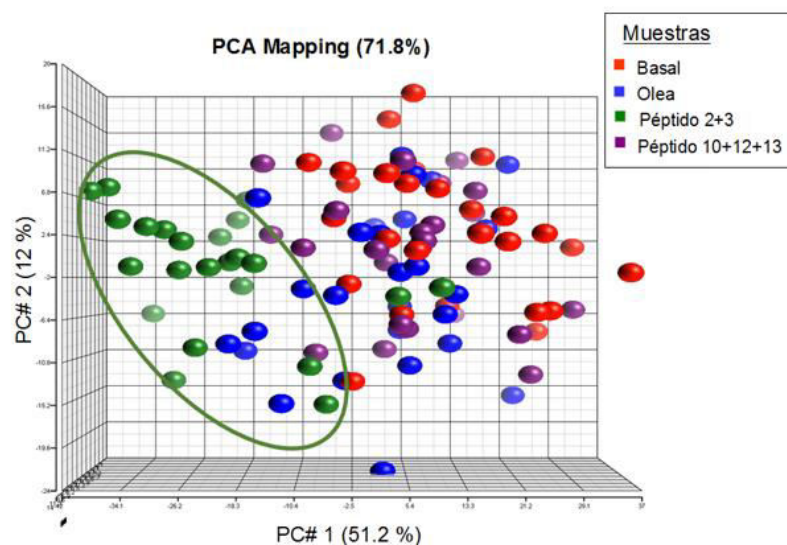


Figura 23. Análisis por PCA de todas las muestras incluidas en el estudio. Las muestras estimuladas con el Péptido 2+3 se agrupan separadas del resto.

Además, para realizar un estudio más exhaustivo, se realizó un PCA para cada uno de los grupos clínicos (Figura 24). En los PCA de los grupos 1 (sujetos no alérgicos), 2 (sujetos asintomáticos) y 3 (pacientes alérgicos no sensibilizados al polen de olivo), no se observó una clara separación de las muestras en función de las diferentes condiciones experimentales planteadas (presencia/ausencia de estímulos), mientras que en el PCA del grupo 4 (pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento), la expresión de los genes analizados permite agrupar las muestras en dos grupos: por un lado, las muestras no estimuladas y todas las demás, por otro. En el PCA del grupo 5 (pacientes alérgicos al polen de olivo tratados con AIT) vemos que las muestras se agrupan en dos, las estimuladas con el Péptido 2+3 por un lado y todas las demás por el otro.

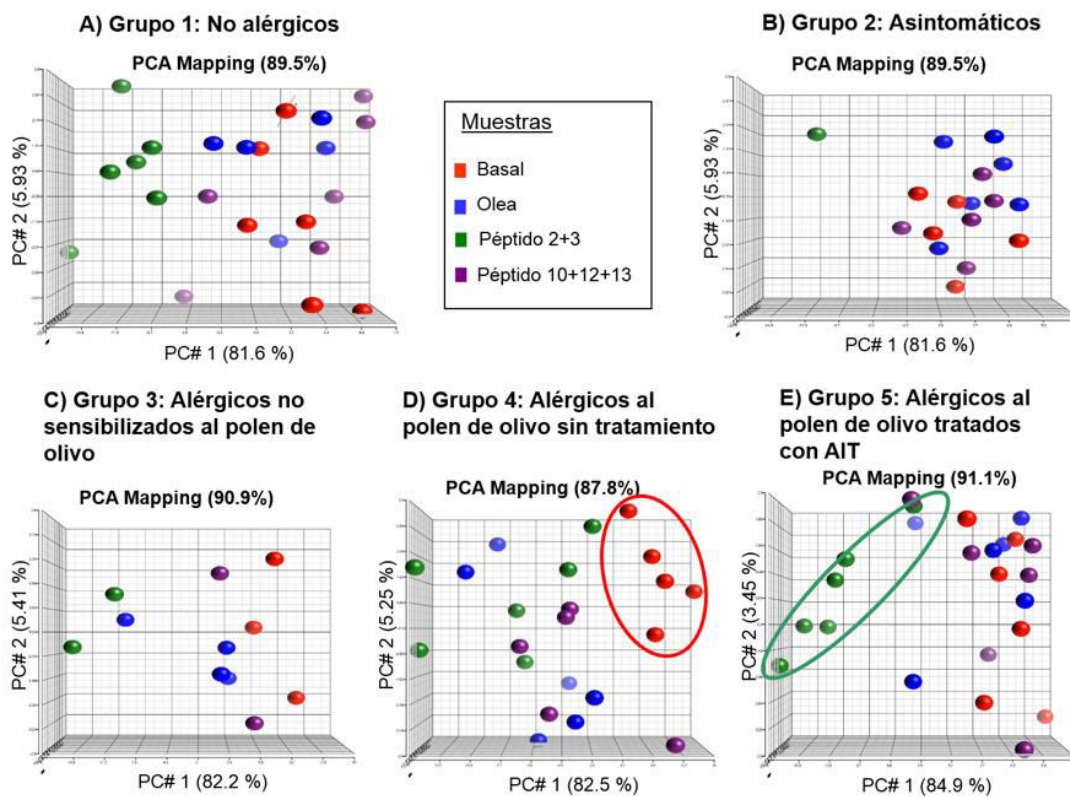


Figura 24. Análisis por PCA de las muestras separadas por cada grupo clínico. A) Sujetos no alérgicos, B) Sujetos asintomáticos, C) Sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo, D) Sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento, E) Sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con AIT. Solo se observan agrupamientos estadísticamente relevantes entre las muestras en los grupos 4 (sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento) y 5 (sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con AIT).

4.2.1 Análisis preliminar de la expresión génica diferencial entre los distintos grupos clínicos respecto al grupo de sujetos no alérgicos

Los primeros análisis se realizaron en el Departamento de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid, por los expertos Jesús García y Pedro Botías. En ellos se estudiaron las diferencias de expresión de las 40.610 sondas, en cada una de las comparaciones intergrupales establecidas.

Como resultado de este análisis, se obtuvo un fichero por cada comparación realizada, donde se muestra un listado de las sondas con su análisis estadístico. Cada sonda viene identificada por su ID (Identificador numérico de la sonda génica, propio de Affymetrix) y el *Gene Symbol* (nombre oficial del gen derivado de diversas organizaciones; Affymetrix utiliza la base de datos UniGene). La significación estadística queda determinada por el p-valor y el cambio de expresión génica o *Fold Change*, de tal modo que si una sonda presenta un p-valor $\leq 0,05$ y el *Fold Change* es ≥ 2 o ≤ -2 , se concluye que la expresión de esa sonda es diferencial en la comparación planteada. El signo del *Fold Change* indica si ese gen está reprimido o sobreexpresado. Así, un *Fold Change* positivo indica que el bloque funcional está enriquecido para la primera condición de la comparación. Por el contrario, un *Fold Change* negativo indica que el bloque funcional está enriquecido en la segunda condición.

En la Tabla 24 se resume el número de sondas génicas diferencialmente expresadas en cada condición, para cada comparación analizada.

Tabla 24. Número de sondas génicas diferencialmente expresadas.

A) Sujetos asintomáticos vs Sujetos no alérgicos.

Condición experimental	Durante la polinización			Fuera de la polinización		
	Nº sondas sobreexpresadas	Nº sondas reprimidas	Nº total sondas con expresión diferencial	Nº sondas sobreexpresadas	Nº sondas reprimidas	Nº total sondas con expresión diferencial
Basal	380	232	612	1.259	726	1.985
Olea	511	711	1.222	108	0	108
Péptido 2+3	97	76	173	4.633	2.991	7.624
Péptido 10+12+13	397	232	629	1254	726	1.980

B) Sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo vs Sujetos no alérgicos.

Condición experimental	Durante la polinización			Fuera de la polinización		
	Nº sondas sobreexpresadas	Nº sondas reprimidas	Nº total sondas con expresión diferencial	Nº sondas sobreexpresadas	Nº sondas reprimidas	Nº total sondas con expresión diferencial
Basal	928	383	1.311	1.095	987	2.082
Olea	994	977	1.971	1.790	1.099	2.889
Péptido 2+3	1.629	1.496	3.125	814	639	1.453
Péptido 10+12+13	1613	1.600	3.213	659	491	1.150

C) Sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs Sujetos no alérgicos.

Condición experimental	Durante la polinización			Fuera de la polinización		
	Nº sondas sobreexpresadas	Nº sondas reprimidas	Nº total sondas con expresión diferencial	Nº sondas sobreexpresadas	Nº sondas reprimidas	Nº total sondas con expresión diferencial
Basal	916	873	1.789	2.045	1.025	3.070
Olea	782	850	1.632	994	739	1733
Péptido 2+3	1.073	793	1.866	866	524	1.390
Péptido 10+12+13	136	160	296	436	582	1.018

D) Sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con AIT vs Sujetos no alérgicos.

Condición experimental	Durante la polinización			Fuera de la polinización		
	Nº sondas sobreexpresadas	Nº sondas reprimidas	Nº total sondas con expresión diferencial	Nº sondas sobreexpresadas	Nº sondas reprimidas	Nº total sondas con expresión diferencial
Basal	2.785	1.572	4.357	809	872	1.681
Olea	1.329	1.174	2.503	898	1.091	1.989
Péptido 2+3	1.158	929	2.087	2.321	1.336	3.657
Péptido 10+12+13	4.440	2.038	6.478	546	739	1.285

P-valor $\leq 0,05$ y *Fold Change* ≥ 2 y ≤ -2 . El número de sondas sobreexpresadas se refiere al número de sondas cuya expresión es mayor en el primer grupo clínico de la comparación respecto al segundo. De forma análoga, las sondas reprimidas son las que muestran menor expresión en el primer grupo clínico de la comparación respecto al segundo.

4.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL ENTRE LOS GRUPOS DE SUJETOS NO ALÉRGICOS Y LOS SUJETOS ALÉRGICOS AL POLEN DE OLIVO SIN TRATAMIENTO

Al igual que en el análisis de citocinas, se ha realizado un estudio más exhaustivo de los grupos sujetos no alérgicos y pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento. Para este análisis colaboramos con varios expertos bioinformáticos: el Dr. Manuel Mata del Departamento de Genómica del Hospital General Universitario en Valencia y los Drs. David Montaner y Joaquín Dopazo del Departamento de Bioinformática de la Unidad de Genómica Funcional del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF).

Los datos primarios (ficheros .cel) sobre los que se discuten estos dos tipos de comparaciones se han depositado en la base de datos *Gene Expression Omnibus* (GEO) del (NCBI) y son accesibles en la web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE54522> mediante el número de acceso GSE54522.

4.3.1 Expresión génica diferencial

Como se describe en el Apartado 7.3.6 de Materiales y Métodos, en estos análisis se aplicó la corrección de Benjamini-Hochberg que, como muestra la Tabla 25, provoca un descenso drástico del número de las sondas génicas diferencialmente expresadas, comparándolas con el análisis preliminar (sin realizar corrección al p-valor) descrito en la Tabla 24 C. Esta corrección es muy restrictiva y pretende reducir el número de falsos positivos (sondas cuyas diferencias de expresión son estadísticamente significativas, aunque realmente no lo son). Sin embargo, este hecho puede provocar un considerable aumento de falsos negativos (sondas que no aparecen como diferenciales pero que realmente sí lo son).

Tabla 25. Número de genes sobreexpresados y reprimidos en los sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento respecto a los sujetos no alérgicos en cada condición experimental.

Condición experimental	Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs No alérgicos					
	Durante la polinización			Fuera de la polinización		
	Nº de genes sobreexpresados	Nº de genes reprimidos	Nº de genes no diferenciales	Nº de genes sobreexpresados	Nº de genes reprimidos	Nº de genes no diferenciales
Basal	0	0	40.610	1	0	40.609
Olea	0	0	40.610	2	7	40.601
Péptido 2+3	0	1	40.609	0	0	40.610
Péptido 10+12+13	0	0	40.610	0	0	40.610

P-valor ajustado $\leq 0,05$ y *Fold Change* ≥ 2 y ≤ -2 .

A nivel Basal, solo encontramos una sonda con diferencias de expresión estadísticamente significativas (fuera del periodo de polinización). Esta sonda corresponde al gen MSR1, ID: 214770_at, cuya expresión es mayor en el grupo de los sujetos alérgicos respecto al de los sujetos no alérgicos (*Fold Change*: 5,45, p-valor ajustado: 0,03).

En las muestras extraídas fuera del periodo de polinización y estimuladas con Olea, se encontraron 9 genes con diferencias de expresión entre los grupos de estudio, 2 genes que se expresan más en los pacientes alérgicos [DEFB124, ID: 1568377_x_at (*Fold Change*: 5,05, p-valor ajustado: 0,03) y el gen SUCNR1, ID: 223939_at (*Fold Change*: 4,83, p-valor ajustado: 0,04)] y 7 genes que se expresan de forma más abundante en los individuos no alérgicos [SPATA6, ID: 220298_s_at, (*Fold Change*: -6,91, p-valor ajustado: 51E-5), C18orf62, ID: 1556288_at, (*Fold Change* -6,11, p-valor ajustado: 0,00), STAMBPL1, ID: 231891_at, (*Fold Change* -5,26, p-valor ajustado: 0,02). CMAH, ID: 229604_at, (*Fold Change* -5,21, p-valor ajustado: 0,02), IL20RB, ID: 228575_at (*Fold Change* de -5,07, p-valor ajustado: 0,03), SLC22A5, ID: 205074_at (*Fold Change*: -4,81, p-valor ajustado: 0,04) y CCDC132, ID: 1554216_at, (*Fold Change*: -4,77, p-valor ajustado: 0,04)].

Cuando se estimulan a las células con el Péptido 2+3 se observa que durante el periodo de polinización el gen TUBG2, ID: 203894_at, se expresa más en los individuos no alérgicos que en los pacientes alérgicos, siendo las diferencias estadísticamente significativas (*Fold Change*: -5,61, p-valor ajustado: 0,02).

4.3.2 Estudio funcional de los genes

Para determinar las implicaciones funcionales de los genes analizados, se llevaron a cabo dos análisis de enriquecimiento: por un lado, utilizando la base de datos *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), para caracterizar rutas biológicas sobreexpresadas o reprimidas, y por otro, la base *Gene Ontology* (GO) que permite analizar diferencias en procesos biológicos. En total se estudiaron 163 vías KEGG y 1.411 términos de GO.

De modo similar al estudio de diferencia de expresión de sondas génicas, estos análisis generan ficheros en los que se indican los p-valores, el *Log Odds Ratio* (LOR) y los identificadores de los genes que componen el bloque para cada ruta biológica KEGG y GO.

4.3.2.1 Vías funcionales definidas por KEGG

La Tabla 26 muestra un resumen del número de vías funcionales, mediante el análisis con KEGG, con diferencias de expresión estadísticamente significativas (p -valor ajustado $\leq 0,05$) entre sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento y los individuos no alérgicos para cada condición experimental.

Tabla 26. Número de vías funcionales, definidas por KEGG, sobreexpresadas y reprimidas en el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento respecto a los sujetos no alérgicos, en cada condición experimental.

Condición experimental	Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs No alérgicos					
	Durante la polinización			Fuera de la polinización		
	Nº vías sobreexpresadas	Nº vías reprimidas	Nº vías no modificadas	Nº vías sobreexpresadas	Nº de vías reprimidas	Nº de vías no modificadas
Basal	24	3	136	31	1	131
Olea	0	0	163	22	1	140
Péptido 2+3	14	0	149	10	0	153
Péptido 10+12+13	21	1	141	18	0	145

P-valor ajustado $\leq 0,05$.

Las Figuras 25 y 26 muestran qué vías tienen alterada su expresión y su significación estadística, durante y fuera del periodo de polinización, respectivamente. El valor de LOR de cada vía se expresa en el eje de abscisas. Un valor de LOR positivo indica que el bloque funcional está enriquecido en el grupo de los pacientes alérgicos, mientras que un LOR negativo, indica que el bloque funcional está enriquecido en el grupo de los sujetos no alérgicos o, lo que es lo mismo, reprimido en los alérgicos.

Figura 25 A) Condición Basal durante el periodo de polinización.

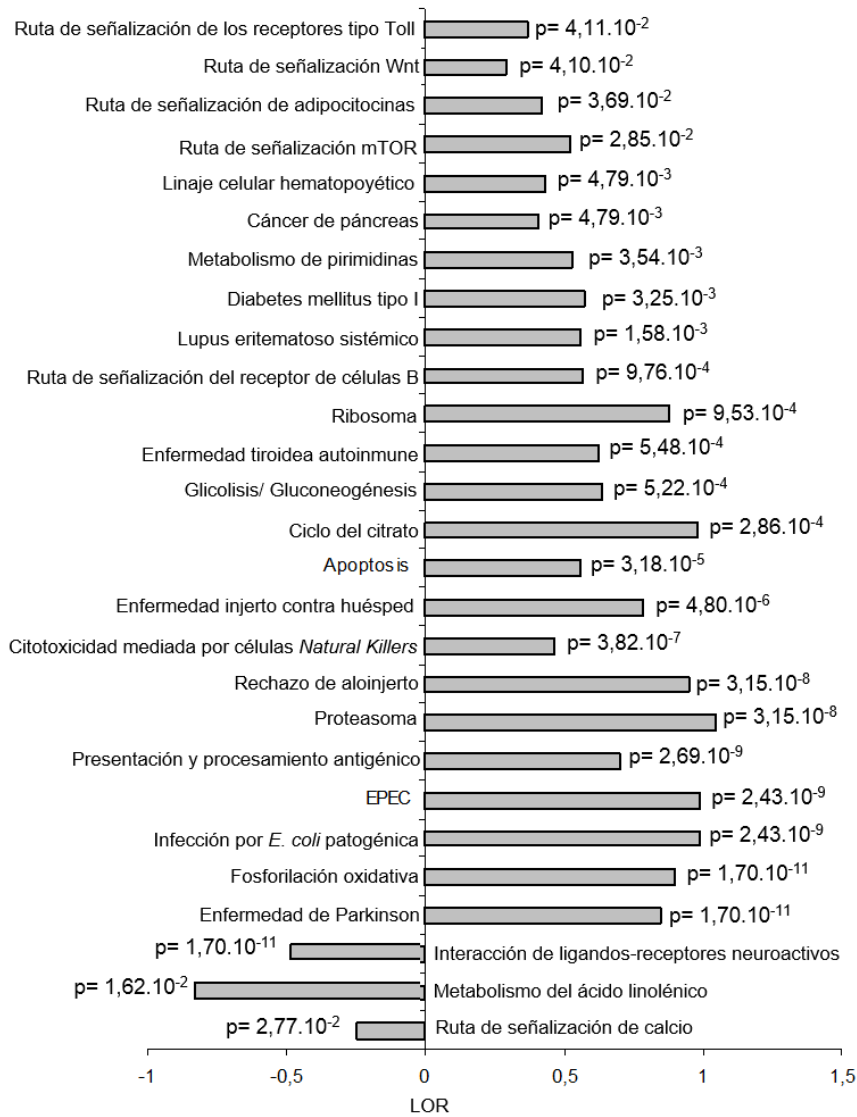


Figura 25 B) Condición Péptido 2+3 durante el periodo de polinización.

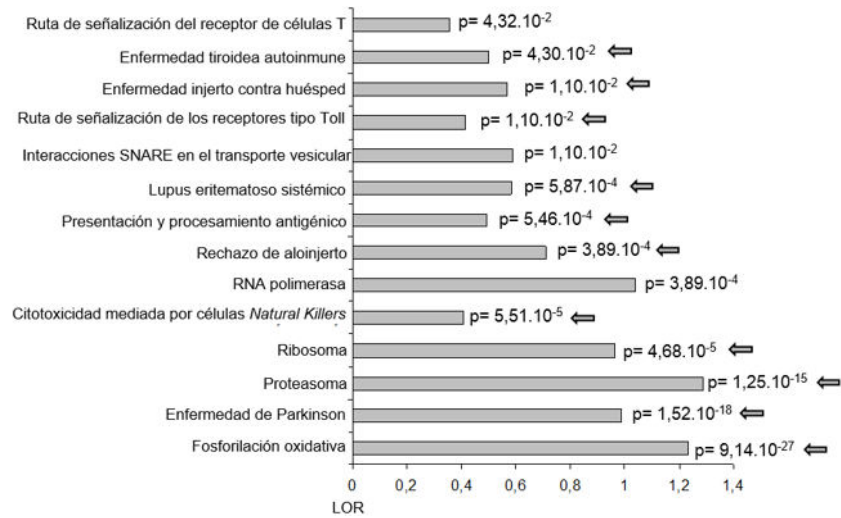


Figura 25 C) Condición Péptido 10+12+13 durante el periodo de polinización.

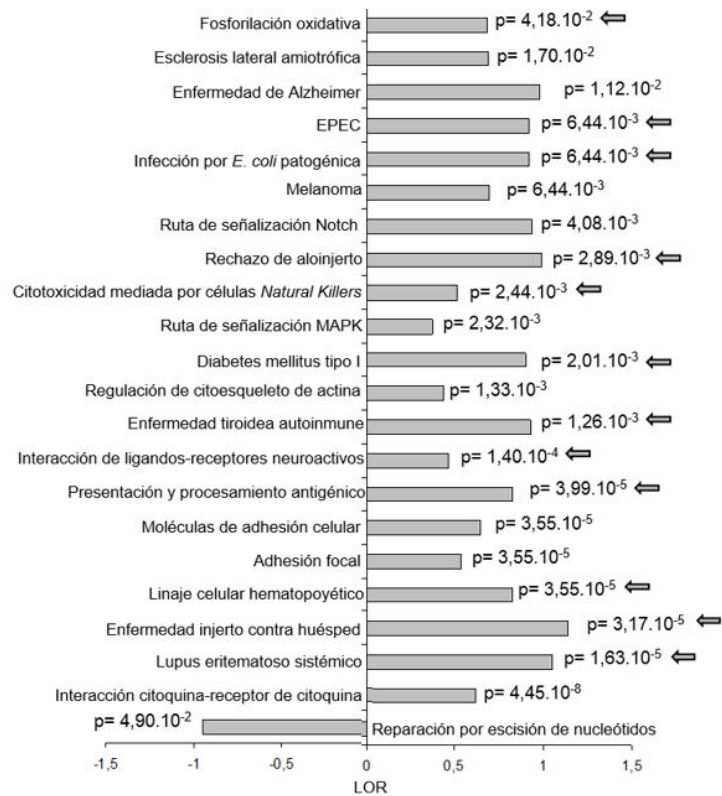


Figura 25. Vías funcionales diferenciales, definidas por KEGG, entre pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento y el grupo de sujetos no alérgicos en cada condición experimental, durante el periodo de polinización. El valor de LOR de cada vía se expresa en el eje de abscisas (un valor de LOR positivo indica que el bloque funcional está enriquecido en el grupo de los pacientes alérgicos mientras que un LOR negativo indica que el bloque funcional está enriquecido en el grupo de los sujetos no alérgicos o, lo que es lo mismo, reprimido en los alérgicos). P= P-valor ajustado $\leq 0,05$. Las flechas grises señalan las vías comunes respecto a la condición Basal.

Figura 26 A) Condición Basal fuera del periodo de polinización.

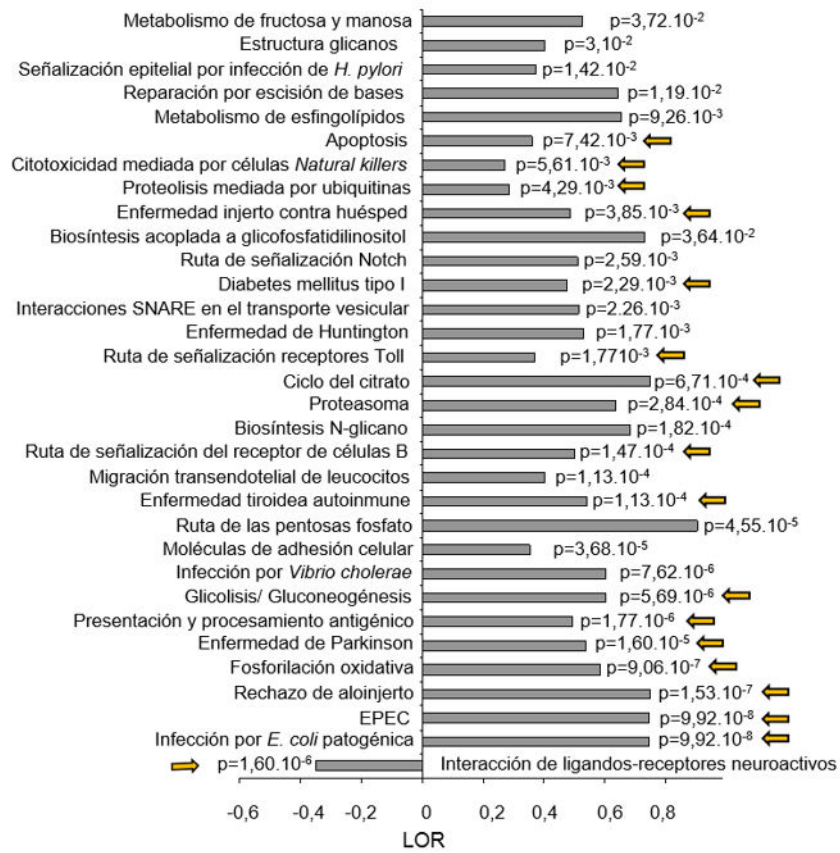


Figura 26 B) Condición Olea fuera del periodo de polinización.

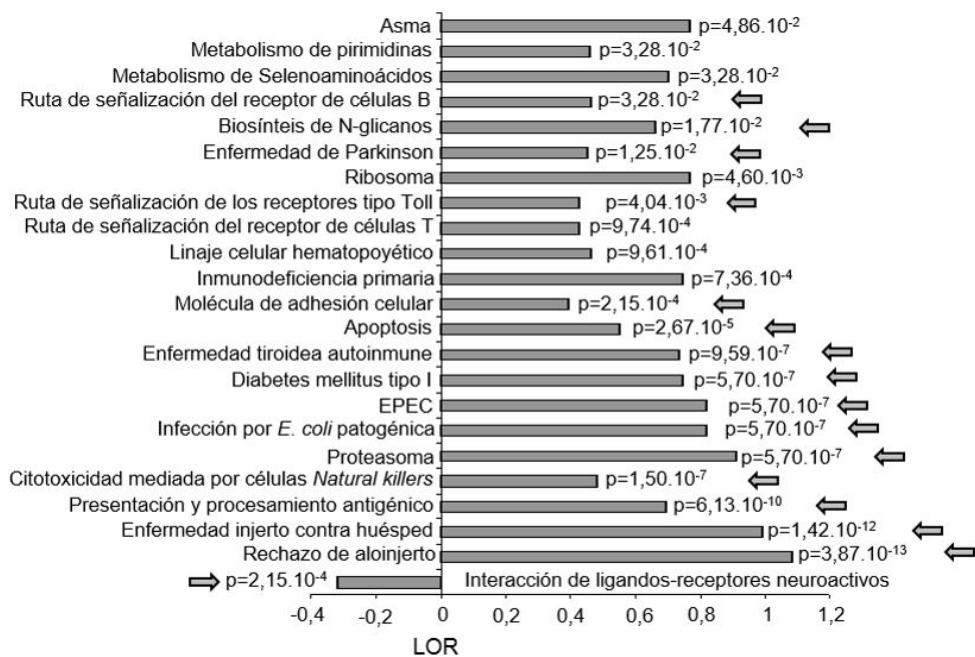


Figura 26 C) Condición Péptido 2+3 fuera del periodo de polinización.

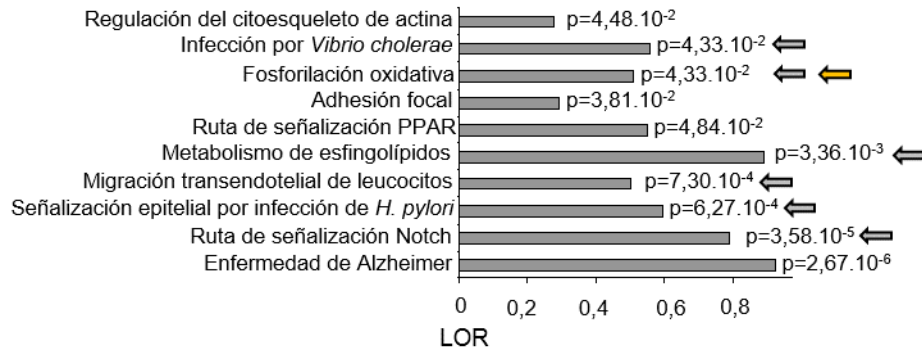


Figura 26 D) Condición Péptido 10+12+13 fuera del periodo de polinización.

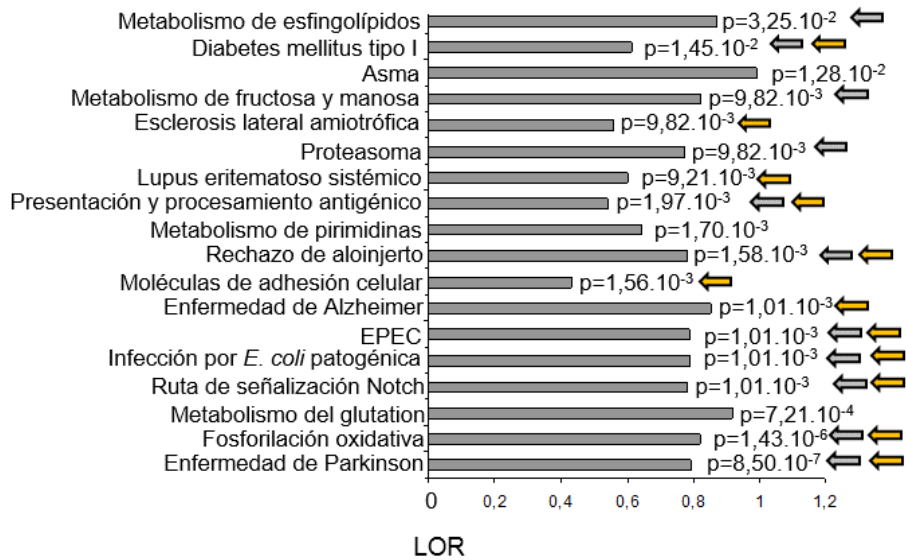


Figura 26. Vías funcionales diferenciales, definidas por KEGG, entre alérgicos al polen de olivo sin tratamiento y el grupo de sujetos no alérgicos, en cada condición experimental, fuera del periodo de polinización. El valor de LOR de cada vía se expresa en el eje de abscisas (un valor de LOR positivo indica que el bloque funcional está enriquecido en el grupo de los pacientes alérgicos mientras que un LOR negativo indica que el bloque funcional está enriquecido en el grupo de los sujetos no alérgicos o, lo que es lo mismo, reprimido en los alérgicos). P= P-valor ajustado $\leq 0,05$. Las flechas amarillas indican las vías comunes dentro y fuera del periodo de polinización, para cada condición experimental (estímulo). Las flechas grises señalan las vías comunes respecto a la condición Basal.

En las Figuras 27 y 28 se muestran dos ejemplos de vías funcionales con diferencias de expresión significativas. Fuera de la estación polínica, ante la estimulación con Olea, la vía "Asma" se encuentra sobreexpresada en los sujetos alérgicos respecto al grupo de los no alérgicos. Por el contrario, en esa misma comparación, los sujetos alérgicos tienen reprimida la vía "Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos".

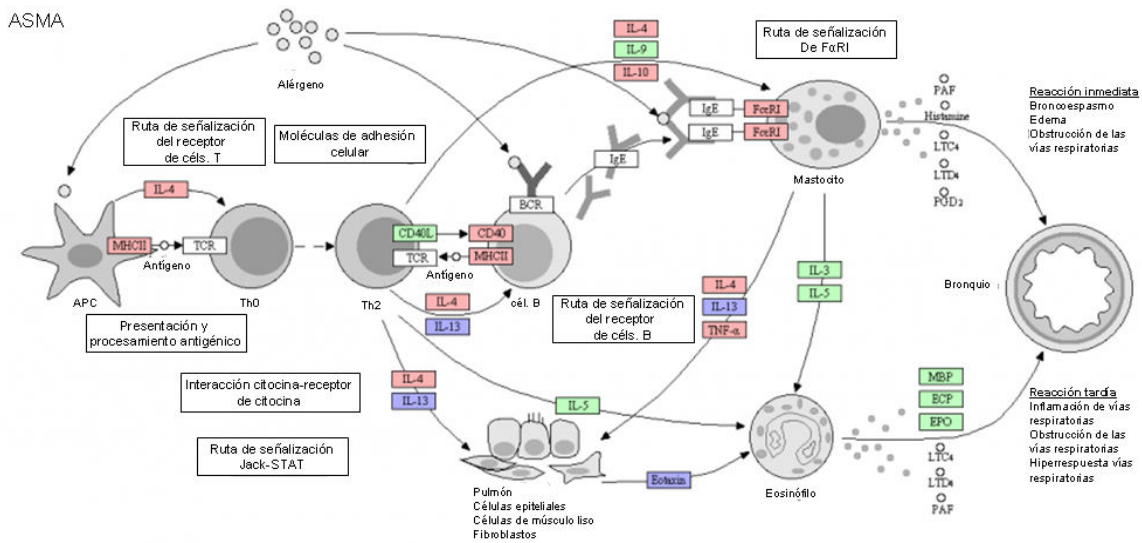


Figura 27. Vía "Asma". Ejemplo de vía funcional KEGG diferencialmente sobreexpresada en los sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento respecto a los sujetos no alérgicos, fuera de la estación polínica. El color del gen indica las diferencias de expresión en cada comparación: Rosa: la expresión del gen es mayor en los sujetos alérgicos que en los que no lo son. Azul: indica que el gen se encuentra reprimido en los pacientes alérgicos respecto a los que no lo son. Verde: la expresión del gen es igual en las dos condiciones de la comparación, no hay cambios en su expresión.

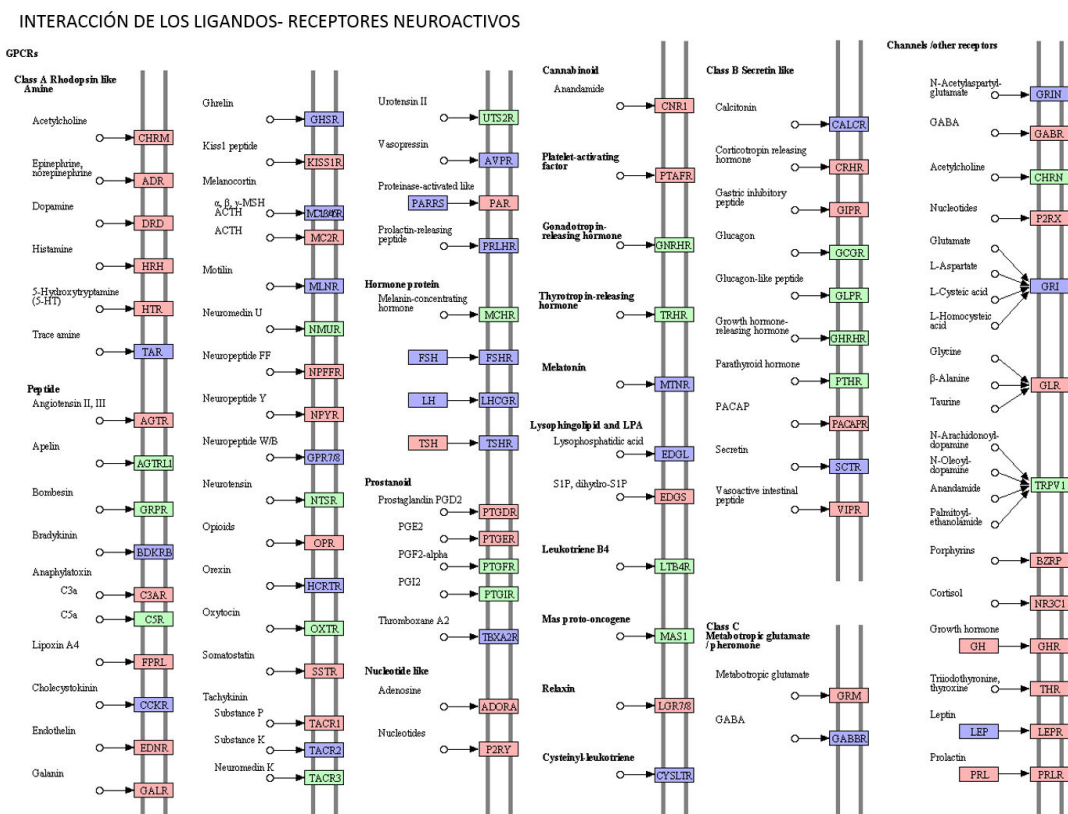


Figura 28. Vía de "Interacción de ligandos-receptores neuroactivos". Ejemplo de vía funcional KEGG diferencialmente reprimida en los sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento respecto a los sujetos no alérgicos, fuera de la estación polínica. El color del gen indica las diferencias de expresión en cada comparación: Rosa: la expresión del gen es mayor en los sujetos alérgicos respecto a los que no lo son. Azul: indica que el gen se encuentra reprimido en los sujetos alérgicos respecto a los que no lo son. Verde: la expresión del gen es igual en las dos condiciones de la comparación, no hay cambios en su expresión.

4.3.2.2 Procesos biológicos definidos por GO

De manera análoga al estudio funcional de los genes mediante la base de datos KEGG, se utilizó la base de datos GO, con la que se realizaron dos tipos de análisis. En el primero, con un carácter más global, se incluyeron todos los términos de GO (en total 1.411 procesos biológicos), aunque hubiera algún término repetido (redundantes) (Tabla 27). En el segundo análisis, se cribaron los elementos redundantes (Tabla 28).

Tabla 27. Número de procesos biológicos GO redundantes, sobreexpresados y reprimidos, en el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento respecto al grupo de sujetos no alérgicos obtenidos, para cada condición experimental.

Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs No alérgicos						
Condición experimental	Durante la polinización			Fuera de la polinización		
	Nº Procesos biológicos sobreexpresados	Nº Procesos biológicos reprimidos	Nº Procesos biológicos no modificados	Nº Procesos biológicos sobreexpresados	Nº Procesos biológicos reprimidos	Nº Procesos biológicos no modificados
Basal	122	35	1.254	129	3	1.279
Olea	4	0	1.407	116	1	1.294
Péptido 2+3	87	0	1.324	65	11	1.335
Péptido 10+12+13	22	3	1.386	61	0	1.350

Significación estadística: p-valor ajustado $\leq 0,05$.

Tabla 28. Número de procesos biológicos GO no redundantes, sobreexpresados y reprimidos, en el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento respecto al grupo de sujetos no alérgicos obtenidos, para cada condición experimental.

Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs No alérgicos				
Condición experimental	Durante la polinización		Fuera de la polinización	
	Nº Procesos biológicos sobreexpresados	Nº Procesos biológicos reprimidos	Nº Procesos biológicos sobreexpresados	Nº Procesos biológicos reprimidos
Basal	62	21	64	3
Olea	3	0	58	1
Péptido 2+3	39	0	36	7
Péptido 10+12+13	15	3	31	0

Significación estadística: p-valor ajustado $\leq 0,05$.

4.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN EL GRUPO DE SUJETOS ALÉRGICOS AL POLEN DE OLIVO SIN TRATAMIENTO

El PCA obtenido en el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento agrupó a las muestras en función del estímulo, lo que sugiere la posibilidad de encontrar sondas, vías funcionales y procesos biológicos con expresión diferencial entre las condiciones experimentales estudiadas (Figura 29) o, lo que es lo mismo, los estímulos utilizados parecen inducir cambios específicos en la expresión génica de las PBMC. Por este motivo, se realizó un estudio más profundo en este grupo de sujetos.

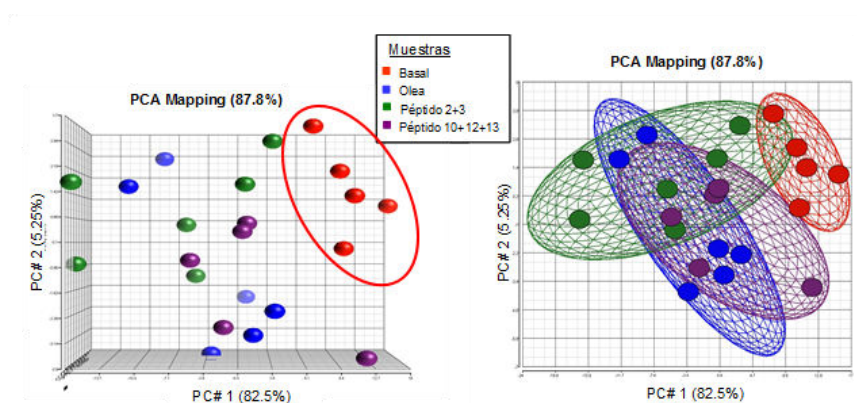


Figura 29. PCA obtenido para el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.

4.4.1 Expresión génica diferencial

En cuanto al número de sondas diferencialmente expresadas, *Fold change* ≥ 2 o ≤ -2 y p-valor sin ajustar $\leq 0,05$, se obtuvo lo indicado en la Tabla 29.

Tabla 29. Número de sondas génicas diferencialmente expresadas en el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.

Comparación	Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento					
	Durante la polinización			Fuera de la polinización		
	Nº Sondas sobreexpresadas	Nº Sondas reprimidas	Total sondas diferenciales	Nº Sondas sobreexpresadas	Nº Sondas reprimidas	Total sondas diferenciales
Olea vs Basal	940	869	1.809	930	1.188	2118
Péptido 2+3 vs Basal	1.789	1.057	2.846	763	863	1626
Péptido 10+12+13 vs Basal	383	258	641	600	877	1477

P-valor $\leq 0,05$ y *Fold Change* ≥ 2 y ≤ -2 . El número de sondas sobreexpresadas se refiere al número de sondas cuya expresión es mayor en la primera condición de la comparación respecto a la segunda. De forma análoga, las sondas reprimidas son las que muestran menor expresión en la primera condición de la comparación respecto a la segunda.

Teniendo en cuenta las correcciones de Benjamini-Hochberg (ajuste del valor p), el número de sondas/genes con diferencias de expresión disminuyó drásticamente. Así, solamente un gen mantuvo una expresión diferencial estadísticamente significativa en todas las comparaciones planteadas: el FAM149A, 222291_at, cuya expresión es mayor cuando se estimula con Olea respecto a la condición Basal, (*Fold Change*: 7,91, p-valor ajustado: 0,01).

4.4.2 Estudio funcional de los genes

4.4.2.1 Vías funcionales definidas por KEGG

El número de vías funcionales KEGG diferencialmente expresadas entre las distintas condiciones experimentales (presencia vs ausencia de estimulación) se muestran en la Tabla 30. El tipo de vías que altera su expresión en cada comparación se muestra en la Tabla 31. De entre todas las vías con expresión diferencial, destaca (debido a su implicación en el S.I.) la vía "Interacción receptores citocina-citocina", sobreexpresada en las muestras de pacientes alérgicos estimuladas con Olea respecto a la condición Basal, en las muestras recogidas durante el periodo de polinización (Figura 30).

Tabla 30. Número de vías funcionales, definidas por KEGG, diferencialmente expresadas en el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.

Comparación	Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento					
	Durante la polinización			Fuera de la polinización		
	Nº vías sobreexpresadas	Nº vías reprimidas	Nº vías no diferenciadas	Nº vías sobreexpresadas	Nº vías reprimidas	Nº vías no diferenciadas
Olea vs Basal	3	2	158	1	0	162
Péptido 2+3 vs Basal	2	2	159	0	0	163
Péptido 10+12+13 vs Basal	3	0	160	0	1	162

P-valor ajustado $\leq 0,05$. El número de vías sobreexpresadas se refiere al número de vías cuya expresión es mayor en la primera condición de la comparación respecto a la segunda. De forma análoga, las vías reprimidas son las que muestran menor expresión en la primera condición de la comparación respecto a la segunda.

Tabla 31. Vías funcionales, definidas por KEGG, diferencialmente expresadas en el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.

A) Comparación Olea vs Basal.

Periodo	Diferencias de expresión	Nombre	Identificador	LOR	p-valor ajustado
Durante la polinización	Vías sobreexpresadas*	Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos	hsa04080	0,4	1,41E-08
		Interacción receptores citocina-citocina	hsa04060	0,25	3,09E-02
		Degradación gamma-Hexaclorociclohexano	hsa00361	0,87	3,09E-02
	Vías reprimidas*	Proteolisis mediada por ubiquitinas	hsa04120	-0,36	4,42E-03
Vía de señalización fosfatidil-inositol		hsa04070	-0,46	3,09E-02	
Fuera de la polinización	Vía sobreexpresada	Leucemia mieloide aguda	hsa05221	0,47	0,024363

B) Comparación Péptido 2+3 vs Basal.

Periodo	Diferencias de expresión	Nombre	Identificador	LOR	p-valor ajustado
Durante la polinización	Vías sobreexpresadas*	Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos	hsa04080	0,42	9,39E-12
		Ribosoma	hsa03010	0,73	1,30E-02
	Vías reprimidas*	Proteolisis mediada por ubiquitinas	hsa04120	-0,34	1,08E-03
		Vía de señalización fosfatidilinositol	hsa04070	-0,43	1,30E-02

C) Comparación Péptido 10+12+13 vs Basal.

Periodo	Diferencias de expresión	Nombre	Identificador	LOR	p-valor ajustado
Durante la polinización	Vías sobreexpresadas*	Fosforilación oxidativa	hsa00190	1,02	8,32E-10
		Enfermedad de Parkinson	hsa05012	0,76	1,69E-05
		Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos	hsa04080	0,4	3,83E-03
Fuera de la polinización	Vía reprimida*	Metabolismo de piruvato	hsa00620	-0,75	3,77E-02

* Vía sobreexpresada o reprimida en la primera condición de la comparación, en función del valor de LOR.

INTERACCIÓN DE RECEPTORES CITOCINA-CITOCINA

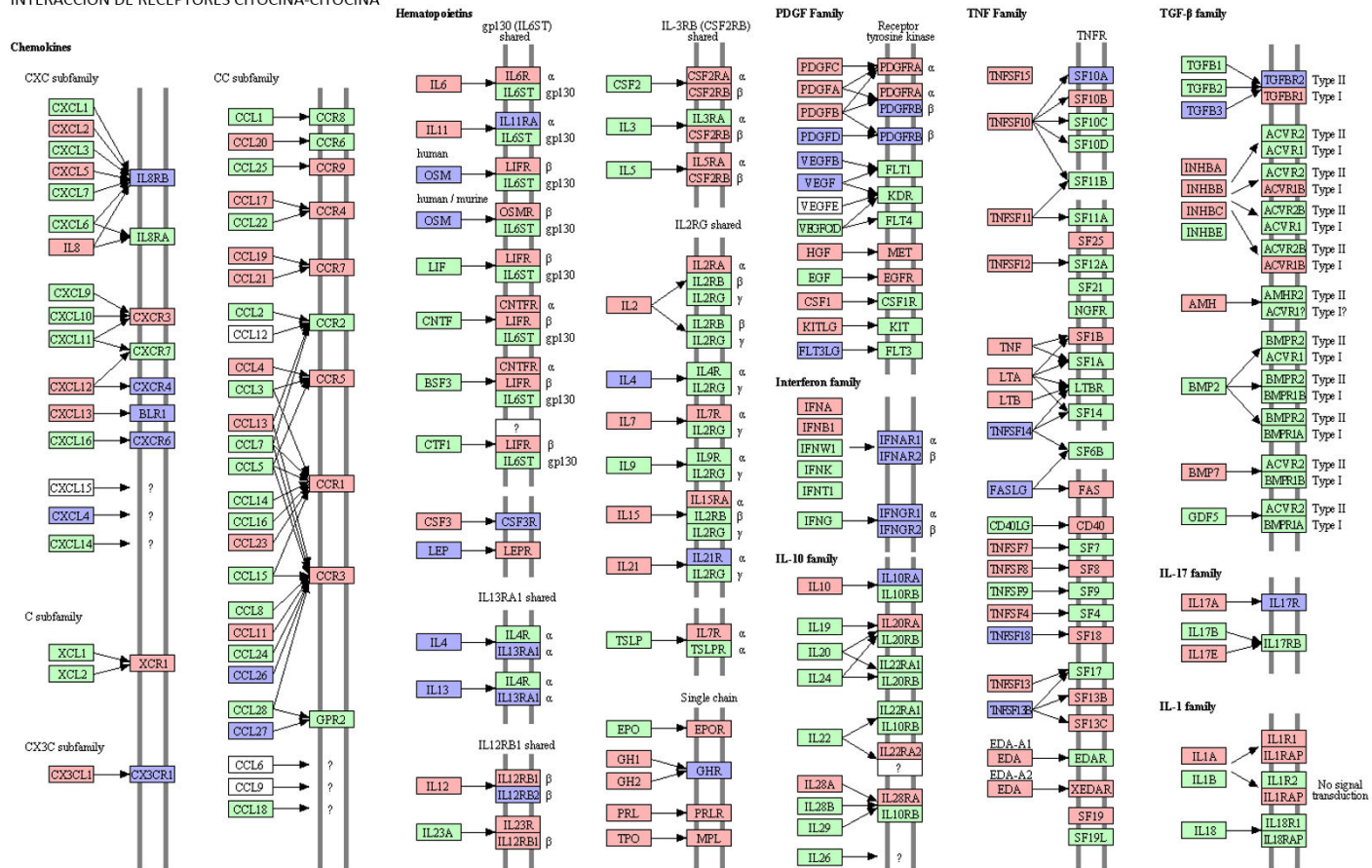


Figura 30. Vía Interacción receptores citocina-citocina. Vía sobreexpresada en los sujetos alérgicos ante la estimulación con Olea respecto a la condición Basal, en las muestras recogidas durante el periodo de polinización. El color del gen indica las diferencias de expresión en cada comparación: Rosa: la expresión del gen es mayor en la condición Olea respecto a la condición Basal. Azul: indica que el gen se encuentra reprimido en la condición Olea respecto al Basal. Verde: la expresión del gen es igual en las dos condiciones de la comparación, no hay cambios en su expresión.

4.4.2.2 Procesos biológicos definidos por GO

En la Tablas 32 y 33 se muestran el número de procesos biológicos GO redundantes y no redundantes (respectivamente), diferencialmente expresados en cada comparación, siguiendo los criterios estadísticos mencionados anteriormente (p -valor ajustado $\leq 0,05$).

Tabla 32. Número de procesos biológicos GO redundantes, diferencialmente expresados en el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.

Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento						
Comparación	Durante la polinización			Fuera de la polinización		
	Nº Procesos biológicos sobreexpresados	Nº Procesos biológicos reprimidos	Nº Procesos biológicos no diferenciados	Nº Procesos biológicos sobreexpresados	Nº Procesos biológicos reprimidos	Nº Procesos biológicos no diferenciados
Olea vs Basal	13	53	1.345	38	24	1.349
Péptido 2+3 vs Basal	12	28	1.371	2	2	1.407
Péptido 10+12+13 vs Basal	14	0	1.397	2	2	1.407

El número de procesos biológicos sobreexpresado se refiere al número de procesos biológicos cuya expresión es mayor en la primera condición de la comparación respecto a la segunda. De forma análoga, los procesos biológicos reprimidos son los que muestran menor expresión en la primera condición de la comparación respecto a la segunda. Significación estadística: p -valor ajustado $\leq 0,05$.

Tabla 33. Número de procesos biológicos GO no redundantes, diferencialmente expresados en el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.

Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento				
Comparación	Durante la polinización		Fuera de la polinización	
	Nº Procesos biológicos sobreexpresados	Nº Procesos biológicos reprimidos	Nº Procesos biológicos sobreexpresados	Nº Procesos biológicos reprimidos
Olea vs Basal	9	29	22	16
Péptido 2+3 vs Basal	10	18	2	2
Péptido 10+12+13 vs Basal	8	0	2	2

El número de procesos biológicos sobreexpresados se refiere al número de procesos biológicos cuya expresión es mayor en la primera condición de la comparación respecto a la segunda. De forma análoga, los procesos biológicos reprimidos son los que muestran menor expresión en la primera condición de la comparación respecto a la segunda. Significación estadística: p -valor ajustado $\leq 0,05$.

5 VALIDACIÓN DE GENES MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR)

La validación de los resultados obtenidos por *microarrays* se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) (siguiendo el protocolo descrito en el Apartado 8 de Materiales y Métodos) en una población de estudio seleccionada a partir de la población inicial, previamente descrita.

5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se seleccionaron 12 sujetos alérgicos al polen de olivo no tratados con inmunoterapia, cuyas características demográficas y clínicas vienen resumidas en la Tabla 34. En este análisis, únicamente se utilizaron las muestras recogidas fuera del periodo de polinización, con el fin de simular a nivel de laboratorio lo que les sucede a los sujetos alérgicos al estar en contacto con el alérgeno, y no una sobreexposición ambiental, como podría ser el estimular las muestras recogidas durante el periodo de polinización.

Tabla 34. Características demográficas y clínicas de los sujetos alérgicos al polen de olivo, sin tratamiento, seleccionados para la validación de genes.

Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento					
N	Media edad (años)	Sexo % mujer/hombre	Niveles de IgE total*(IU/ml)	Niveles de IgE específica* (kUA/l)	Diagnóstico clínico
12	33 ± 10	83/17	208,3 ± 180,95	48,57 ± 38,57	100% Asma/ Rinitis

*Datos obtenidos fuera del periodo de polinización.

5.2 SELECCIÓN DE LOS GENES A VALIDAR

A partir de los resultados obtenidos en el estudio de *microarrays* para el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento (Tabla 29), en las distintas condiciones experimentales analizadas, se seleccionaron los 189 genes más representativos (según los criterios descritos en el Apartado 8.3 de Materiales y Métodos) para su validación por qRT-PCR (Tabla 35). Los genes endógenos utilizados en el estudio fueron 18S, GAPDH y β 2 microglobulina.

Tabla 35. Genes seleccionados para validación por qRT-PCR.

Símbolo	Nombre completo
A2M	α 2-Macroglobulina
ADORA2A	Receptor A2a de adenosina
ABHD2	Dominio 2 portador de abhidrolasa (Abhidrolasa que contiene el dominio 2)
ABHD12	Dominio 12 portador de abhidrolasa (Abhidrolasa que contiene el dominio 12)
ADAM19	Dominio19 de la metalopeptidasa ADAM (Miembro de la familia ADAM con actividad metalopeptidasa en el dominio 19)
ADAM28	Dominio 28 de la metalopeptidasa ADAM (Miembro de la familia ADAM con actividad metalopeptidasa en el dominio 28)
ADCY1	Adenilato ciclasa 1
ADORA2B	Receptor A2b de adenosina
ALOX5	Lipooxigenasa 5 de araquidonato
APOE	Apolipoproteína E
ASRGL1	Asparaginasa tipo 1 (Proteína 1 similar a asparaginasa)
ATAD3A,	Familia de la ATPasa, dominio 3A portador de AAA
ATP13A3	ATPasa tipo 13A3
ATRN	Atractina
BCL6	Célula B CLL/linfoma 6
BRAF	Homólogo B1 del oncogen del sarcoma viral múrido v-raf
BTRC	Repetición beta-transducina portador de la proteína ubiquitina ligasa E3
C1QC	Cadena C del componente C1q del Sistema del Complemento
C11orf45	Marco de lectura abierto 45 del cromosoma 11
CALHM2	Modulador 2 de la homeostasis del calcio
CALM1	Calmodulina 1
CAMK1	Proteínquinasa I dependiente de calcio/calmodulina
CBS	Beta-sintetasa de la cistationina
CCL4	Ligando 4 de quimiocinas con motivo C-C
CCL20	Ligando 20 de quimiocinas con motivo C-C
CCL22	Ligando 22 de quimiocinas con motivo C-C
CD4	Cúmulo de diferenciación 4
CD36	Cúmulo de diferenciación 36 (receptor de trombospondina)
CD55	Cúmulo de diferenciación 55, factor de aceleración de decaimiento para el complemento (grupo sanguíneo <i>Cromer</i>)
CD84	Cúmulo de diferenciación 84
CD86	Cúmulo de diferenciación 86
CD93	Cúmulo de diferenciación 93
CD101	Cúmulo de diferenciación 101
CD163	Cúmulo de diferenciación 163
CGGBP1	Proteína 1 de unión al triplete de repetición CGG
CLDN12	Claudina 12
CNTROB	Centrobina (proteína de interacción con BRCA2 del centrosoma)
COL23A	Colágeno tipo XXIII α 1
CRELD1	Proteína con un dominio 1 similar al factor de crecimiento endotelial (EGF) rico en

	cisteína
CREM	Modulador de elementos de respuesta al AMPc
CRLF2	Receptor de citocinas similar al factor 2 (Receptor de TSLP)
CRTAP	Proteína asociada a cartílago
CSTA	Cistatina A
CTSG	Catepsina G
CXCL1	Ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad alfa estimuladora del crecimiento de melanoma)
DAB2	Homólogo 2 desactivado, fosfoproteína receptiva de mitógeno (<i>Drosophila</i>)
DEFB124	Defensina, beta 124
DHRS9	Miembro 9 de la deshidrogenasa/reductasa (familia SDR)
DNAJB9	Homólogo DnaJ (Hsp40), subfamilia B, miembro 9
DNMT1	Metiltransferasa 1 de DNA
DOK2	Proteína de acoplamiento 2, 56kDa
DUSP4	Fosfatasa 4 con especificidad dual
DYRK3	Quinasa 3 de especificidad dual regulada por fosforilación en tirosina (Y)
EBI3	Virus 3 inducido por <i>Epstein-Barr</i>
EDN1	Endotelina 1
ELOVL7	Elongasa 7 del ácido graso ELOVL
EMR3	Gen que codifica a un miembro de la familia de receptores transmembrana (similar al receptor de hormonas 3) con motivos similares al factor de crecimiento endotelial y a la mucina
EPHB2	Receptor B2 de epinefrina (EPH)
ERBB3	Homólogo 3 del oncogen viral v-erb-b2 de leucemia eritroblástica aviar. Codifica por un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidermal.
EREG	Epirregulina
FAAH2	Hidrolasa 2 de amidas de ácidos grasos
FABP4	Proteína de unión a ácidos grasos, encontrada en adipocitos
FBXO2	Proteína 2 de la caja F. Subunidad del complejo ubiquitina proteína-ligasa
FCN1	Ficolina 1, con probable actividad de unión a la elastina
FN1	Fibronectina 1
FOXP1	Factor de transcripción de la familia <i>forkhead box P1</i>
FPR3	Receptor 3 del péptido formil
FSD1L	Fibronectina tipo III y dominio tipo, portador de SPRY
FUCA1	Fucosidasa, alfa-L-1, enzima lisosomal que degrada glicoproteínas y glicolípidos que contienen fucosa
GAA	Alfa glicosidasa ácida
GABPB1	Subunidad beta 1 del factor de transcripción de proteínas de unión a GA
GDE1	Fosfodiesterasa 1 del glicerofosfodiéster
GOSR1	Miembro 1 del complejo del receptor SNAP del Golgi
GPBP1	Proteína 1 de unión a promotores ricos en GC (también llamada vasculina)
GPNMB	Glicoproteína transmembrana NMB
HFE	Hemocromatosis. La proteína codificada por este gen es una proteína de membrana similar a las proteínas de MHC-I y se asocia a la β 2-microglobulina
HMGB2	Proteínas tipo caja 2, del grupo de alta movilidad. Podrían facilitar las interacciones entre proteínas que actúan en cis, promoviendo la flexibilidad del DNA
HRH4	Receptor H4 de la histamina

HSPA6	Proteína 6 <i>heat shock</i> de 70kDa (HSP70B')
ICOS	Molécula coestimuladora inducible
IDO1	Dioxigenasa 1 del 2,3 indoleaminina
IER3	Respuesta inmediata temprana 3
IER5	Respuesta inmediata temprana 5
IL1A	Interleucina 1, alfa
IL1B	Interleucina 1 beta
IL2RA	Receptor de Interleucina 2, alfa
IL6	Interleucina 6 (interferon, beta 2)
IL8	Interleucina 8
IL12B	Interleucina 12B (factor estimulador de células <i>natural killer</i> 2, factor de maduración linfocitario citotóxico 2, p40)
IL13RA1	Interleucina 13 receptor, alfa 1
IL15	Interleucina 15
IL19	Interleucina 19
IL24	Interleucina 24
INHBA	β A-inhibina
IRAK2	Quinasa 2 asociada al receptor de interleucina 1
ITGB3	β 3-Integrina (glicoproteína de plaquetas IIIa, antígeno CD61)
ITGB8	β 8-Integrina
KRAS	Homólogo del oncogén viral v-Ki-ras2, del sarcoma de rata Kirsten
KREMEN1	Proteína de transmembrana 1, portadora de <i>kringle</i>
LAPTM4B	Proteína de transmembrana lisosomal β 4
LCP2	Proteína citosólica linfocitaria 2 (dominio SH2, portador de la proteína leucocitaria de 76kDa)
LGMN	Leguminosa
LRP1	Proteína 1, relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad
MAFF	Homólogo F del oncogén v-maf del fibrosarcoma musculoaponeurótico aviar
MAMLD1	Gen que codifica por una proteína que contiene el dominio 1 similar al <i>mastermind</i> (cerebro)
MAP3K4	Proteína-quinasa quinasa quinasa 4 activada por mitógeno
MPEG1	Expresado en macrófago 1
ME1	Enzima malice
MET	MET protooncogén (receptor del factor de crecimiento hepático)
MIR155HG	Gen huésped de MIR155 (no codificante de proteína)
MMP1	Metalopeptidasa de matriz 1 (colagenasa intersticial)
MMP7	Metalopeptidasa de matriz 7 (matrilisina, utirina)
MMP10	Metalopeptidasa de matriz 10 (estromelisin 2)
MS4A1	Dominios de expansión de membrana 4, subfamilia A, miembro 1
MSR1	Receptor <i>scavenger</i> de macrófago 1
MYO5A	Miosina VA (cadena pesada 12, miosina)
MYOF	Mioferlina
NAMPT	Fosforribosiltransferasa nicotinamida
NBN	Nibrina
NFKBIZ1	Factor nuclear del gen del polipéptido de cadena ligera kappa, potenciador inhibidor de células B, zeta

OGFRL1	Factor de crecimiento opioide tipo 1
OSM	Oncostatina M
PDGFA	Polipéptido del factor de crecimiento alfa derivado de plaquetas
PECAM1	Molécula de adhesión celular plaquetario/endotelial 1
PI4K2A	Quinasa tipo 2, alfa fosfatidilinositol 4
PLA2G15	Fosfolipasa A2, grupo XV
PMFBP1	Proteína de unión 1 al factor de modulación de poliamina 1
POLR3H	Polipéptido H de la RNA polimerasa III (22.9kD)
PRKACA	Proteína quinasa dependiente de AMPc, subunidad catalítica alfa
PPARG	Receptor gamma activado por el factor de proliferación de peroxisomas
PPT1	Tioesterasa de la proteína palmitoil 1
PSAP	Prosaposina
PTGER2	Receptor 2 de la prostaglandina E (subtipo EP2), 53kDa
PTGFRN	Regulador negativo del receptor de prostaglandina F2
PTGS2	Sintetasa 2 de prostaglandina-endoperoxida (sintetasa y ciclooxigenasa de prostaglandina G/H)
RAB12	Miembro RAS de la familia de oncogenes
RASA2	Activador proteico 2 de RAS, p21
RBPJ	Proteína de señalización de recombinación para la región J de la cadena kappa de inmunoglobulinas
RGS14	Regulador de proteína de señalización G número 14
RGS16	Regulador de proteína de señalización G número 16
RNASE1	Ribonucleasa, familia RNase A, 1 (pancreática)
RRAS	Homólogo relacionado al oncogén viral RAS (r-ras)
SAE1	Subunidad enzimática 1 activadora de SUMO1
SAMSN1	Dominio SAM, dominio SH3 y señales de localización nuclear 1
SCARF1	Receptor <i>scavenger</i> clase F número 1
SEMA6B	Dominio sema, dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico, (semaforina) 6B
SERPINB2	Inhibidor de serpín peptidasa, subtipo B (ovalbumina), miembro 2
SERPINB9	Inhibidor de serpín peptidasa, subtipo B (ovalbumina), miembro 9
SKP1	Proteína 1 asociada a la quinasa de fase S
SLC1A2	Familia de portadores de solutos 1 (transportador glial de glutamato de alta afinidad), miembro 2
SLC8A1	Miembro 1 de la familia de portadores de solutos 8 (intercambiador de sodio/calcio).
SLC23A2	Familia de portadores de solutos 23 (transportadores de base nuclear)
SLC24A6	Familia de portadores de solutos 24 (intercambiador de sodio/litio/calcio), miembro 6
SLC39A11	Familia de portadores de solutos 39 (transportador de iones metales), miembro 11
SLCO2B1	Familia de portadores de solutos de aniones orgánicos
SMCHD1	Dominio 1 portador de mantenimiento estructural de la bisagra flexible de cromosomas
SMG5	Homólogo smg-5, factor de decaimiento mediado por mRNA antisentido (<i>C. elegans</i>)
SOCS3	Supresor 3 de señalización de citocinas
SOS1	Homólogo 1 de <i>son of sevenless</i> (<i>Drosophila</i>)
SPINK1	Inhibidor de serín peptidasa
SPIRE1	Factor 1 de nucleación de actina tipo aguja (<i>Drosophila</i>)
STAB1	Estabilina 1

ST14	Supresión de la tumorigenicidad 14 (carcinoma de colon)
SYNJ2	Sinaptojanina 2. Es un miembro de la familia inositol-polifosfato 5 fosfatasa
TANK	Activador NFKB asociado al miembro de la familia TRAF
TDO2	Dioxigenasa del 2,3 triptófano
TFPI2	Inhibidor 2 de la vía del factor de tejido
TGFA	Factor de crecimiento transformante α
TGFBI	Factor de crecimiento transformante, beta-inducido, 68kDa
TGIF1	Factor <i>homeobox</i> 1 inducido por TGFB
THBD	Trombomodulina
TLR4	Receptor tipo <i>toll</i> 4
TM4SF1	Miembro 1 de la familia Transmembrana 4 L6
TMEM150B	Proteína transmembrana 150B
TNS1	Tensina 1
TREM1	Receptor iniciador 1 expresado en células mieloides
TREM2	Receptor iniciador 2 expresado en células mieloides
TSC22D1	Familia del dominio TSC22, miembro 1
TSPAN13	Tetraspanina 13
UAP1L1	UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa 1 del tipo 1
UBASH3B	Dominio portador B de SH y asociado a ubiquitina
VEGFA	Factor de crecimiento A del endotelio vascular
VNN1	Vanina 1
VSIG4	Codifica por un dominio de inmunoglobulinas y v-set incluido en una proteína relacionada con proteínas de regulación inmune.
WNT5A	Familia del sitio de integración MMTV del tipo <i>Wingless</i> , miembro 5A
ZBTB7A	Dominio portador 7A de BTB y dedo de zinc
ZFYVE19	Dominio portador 19 de FYVE y dedo de zinc
ZNF226	Proteína 226 de dedo de zinc
ZNF467	Proteína 467 de dedo de zinc

Genes endógenos

18S	Subunidad de 18 unidades Svedberg del ribosoma
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
B2M	β -2 Microglobulina

Aunque se analizaron la expresión de tres endógenos, finalmente, para el estudio de validación, se utilizó como gen de referencia el 18S, por ser el gen que presentó los Ct más estables.

5.3 ANÁLISIS A NIVEL GLOBAL

En este análisis obtuvimos datos muy relevantes que confirmaron que los distintos estímulos producían cambios a nivel de expresión génica, como ya se vio mediante los estudios por *microarrays*. Además, empleando un modelo jerárquico no supervisado se observó que los cambios de expresión permitían separar las muestras estimuladas con el Péptido 2+3 de todas las demás, es

decir, que las muestras estimuladas con este Péptido tienen una expresión muy similar de estos 189 genes y que esa expresión es muy diferente de las demás muestras, como indica la Figura 31.

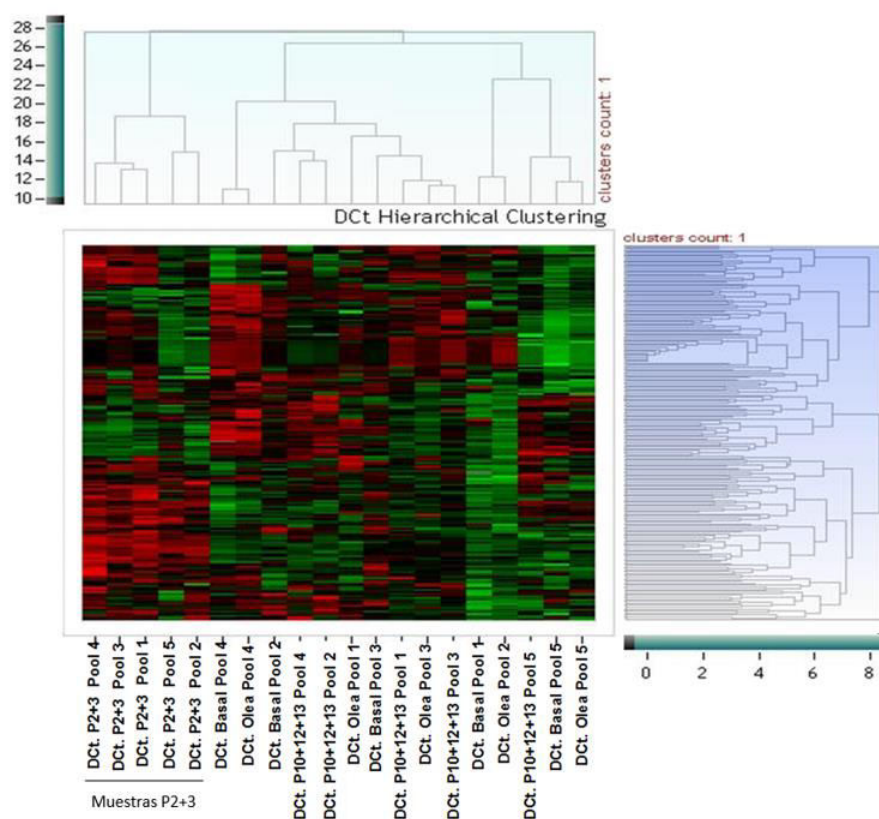


Figura 31. Heat map de los 189 genes. Agrupamiento de las muestras de *pools* en relación a la expresión de los 189 genes analizados.

5.4 ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

Para valorar qué genes tienen diferencias de expresión, se realizaron comparaciones de las medias de ΔCt entre las distintas condiciones para cada gen ($\Delta\Delta Ct$).

Las comparaciones realizadas fueron:

$$\Delta\Delta Ct (\text{Olea-Basal}) = \text{media } \Delta Ct (\text{pools Olea}) - \text{media } \Delta Ct (\text{pools Basal})$$

$$\Delta\Delta Ct (\text{Péptido 2+3-Basal}) = \text{media } \Delta Ct (\text{pools Péptido 2+3}) - \text{media } \Delta Ct (\text{pools Basal})$$

$$\Delta\Delta Ct (\text{Péptido 10+12+13-Basal}) = \text{media } \Delta Ct (\text{pools Péptido 10+12+13}) - \text{media } \Delta Ct (\text{pools Basal})$$

$$\Delta\Delta Ct (\text{Péptido 2+3-Olea}) = \text{media } \Delta Ct (\text{pools Péptido 2+3}) - \text{media } \Delta Ct (\text{pools Olea})$$

$$\Delta\Delta Ct (\text{Péptido 10+12+13-Olea}) = \text{media } \Delta Ct (\text{pools Péptido 10+12+13}) - \text{media } \Delta Ct (\text{pools Olea})$$

$\Delta\Delta Ct$ (Péptido 10+12+13-Péptido 2+3)= media ΔCt (pools Péptido 10+12+13) – media ΔCt (pools Péptido 2+3)

De todas las comparaciones realizadas, solo en las que participa la condición Péptido 2+3 se observaron resultados estadísticamente significativos (p-valor ajustado $\leq 0,05$) (Tabla 36).

Tabla 36. Número de genes diferenciales estadísticamente significativos en cada comparación.

Comparación	Nº genes diferenciales
Olea vs Basal	0
Péptido 2+3 vs Basal	36
Péptido 10+12+13 vs Basal	0
Péptido 2+3 vs Olea	30
Péptido 10+12+13 vs Olea	0
Péptido 10+12+13 vs Péptido 2+3	38

Cuando se compara la condición Péptido 2+3 respecto al Basal, 36 genes muestran diferencias de expresión: 10 de los genes tienen mayor expresión bajo la estimulación con el Péptido 2+3 que la condición Basal (CCL22, CXCL1, IL1A, IL1B, IL6, INHBA, PTGS2, SERPINB2, TFPI2 y WNT5A), indicados en color rojo en la Tabla 37. Veintiseis, se encuentran reprimidos (APOE, C1QC, CAMK1, CD36, CD86, DNMT1, FCN1, FPR3, FUCA1, GAA, GPNMB, LGMN, LRP1, ME1, MYOF, PI4K2A, PSAP, RNASE1, SEMA6B, SPINK1, ST14, STAB1, TGFBI, TLR4, TREM2 y ZNF467), que aparecen en la Tabla 37 en color azul.

En la comparación Péptido 2+3 vs Olea, el Péptido 2+3 promueve una mayor expresión de los genes FAAH2, IL6, PTGS2 y TFPI2, (aparecen en color rojo en la Tabla 38). Mientras, reprime la expresión de 26 genes (ADAM28, APOE, CAMK1, CD36, CD86, FCN1, FPR3, FUCA1, GAA, GDE1, GPNMB, LGMN, LRP1, ME1, MPEG1, MYOF, PI4K2A, PSAP, RNASE1, SEMA6B, SPINK1, ST14, STAB1, TGFBI, TLR4 y UBASH3B), los cuales aparecen en color azul en la Tabla 38.

En la comparación entre los Péptidos 2+3 y 10+12+13, el Péptido 2+3 promueve la expresión de CCL20, CCL22, CXCL1, EBI3, IL1A, IL1B, IL24, IL2RA, IL6, ITGB8, MIR155HG, PTGS2, SERPINB2, TFPI2 y TREM1 (indicados en rojo en la Tabla 39), mientras que el Péptido 10+12+13 promueve la expresión de ABHD2, APOE, CAMK1, CD36, CD84, DAB2, FCN1, FPR3, FUCA1, GPNMB, LGMN, LRP1, ME1, MPEG1, MYOF, PSAP, RNASE1, SEMA6B, SPINK1, ST14, STAB1, TGFBI, y TLR4, que aparecen en azul en la Tabla 39.

Tabla 37. Comparación Péptido 2+3 vs Basal.

Gen-Sonda	Media Δ Ct Péptido2+3	Desviación estándar Δ Ct Péptido2+3	Media Δ Ct Basal	Desviación estándar Δ Ct Basal	$\Delta\Delta$ Ct Péptido2+3-Basal	p-valor ajustado
APOE-Hs001711168_m1	21,49	1,07	17,97	1,04	3,53	1,49E-03
C1QC-Hs00757779_m1	20,96	1,35	18,31	1,65	2,65	3,20E-02
CAMK1-Hs00269334_m1	20,67	1,01	16,98	0,83	3,69	7,71E-04
CCL22-Hs99999075_m1	15,64	1,03	18,27	0,85	-2,63	1,57E-02
CD36-Hs00354519_m1	20,49	1,63	17,50	1,58	2,99	1,57E-02
CD86-Hs01567025_m1	21,03	1,05	18,22	0,33	2,81	7,87E-03
CXCL1-Hs00236937_m1	11,61	0,56	16,07	3,20	-4,45	2,17E-03
DNMT1-Hs00154749_m1	19,88	1,08	17,62	0,81	2,26	3,94E-02
FCN1-Hs00157572_m1	21,01	0,72	16,66	1,40	4,35	2,71E-04
FPR3-Hs01574392_m1	19,56	1,81	14,07	1,67	5,49	8,81E-05
FUCA1-Hs00609173_m1	20,79	0,84	16,55	1,99	4,23	7,35E-04
GAA-Hs01089838_m1	20,25	1,90	17,60	1,49	2,64	3,94E-02
GPNMB-Hs01095669_m1	20,58	0,91	12,96	1,32	7,62	5,21E-08
IL1A-Hs00899848_m1	17,65	0,56	20,26	2,25	-2,61	3,94E-02
IL1B-Hs99999029_m1	11,25	0,68	14,89	2,54	-3,64	5,55E-03
IL6-Hs00985639_m1	15,04	0,81	20,27	1,56	-5,23	4,31E-05
INHBA-Hs01081598_m1	16,02	0,60	18,97	2,96	-2,95	3,94E-02
LGMN-Hs00271599_m1	19,91	0,72	16,15	0,86	3,76	6,48E-04
LRP1-Hs00233856_m1	20,74	1,04	16,94	0,74	3,80	6,48E-04
ME1-Hs01554892_m1	21,31	1,01	18,02	1,17	3,28	3,15E-03
MYOF-Hs00203853_m1	20,57	1,15	16,48	1,27	4,08	6,48E-04
PI4K2A-Hs00218300_m1	19,67	1,48	17,16	1,60	2,51	4,25E-02
PSAP-Hs01551096_m1	15,04	0,46	12,84	0,53	2,20	3,36E-02
PTGS2-Hs00153133_m1	15,82	1,09	19,93	2,14	-4,12	1,27E-03
RNASE1-Hs00379274_m1	20,78	0,77	17,06	1,06	3,72	7,55E-04
SEMA6B-Hs00220339_m1	18,22	1,44	15,32	1,06	2,90	1,25E-02
SERPINB2-Hs01010736_m1	10,81	0,56	13,97	2,34	-3,16	1,29E-02
SPINK1-Hs00162154_m1	20,42	1,20	16,79	2,07	3,63	4,02E-03
ST14-Hs01058386_m1	20,57	0,86	16,97	0,79	3,60	8,03E-04
STAB1-Hs00248439_m1	20,13	0,54	15,87	0,92	4,26	1,81E-04
TFPI2-Hs00197918_m1	17,63	0,21	21,25	1,85	-3,62	1,93E-03
TGFBI-Hs00932747_m1	19,34	0,54	14,28	1,34	5,06	4,31E-05
TLR4-Hs00152939_m1	21,43	1,03	17,40	1,12	4,03	6,39E-04
TREM2-Hs00219132_m1	21,49	1,07	18,85	0,93	2,65	1,57E-02
WNT5A-Hs00998537_m1	18,30	1,25	21,23	1,37	-2,93	1,25E-02
ZNF467-Hs00737097_m1	21,49	1,07	19,01	0,39	2,48	1,93E-02

Los resultados de $\Delta\Delta$ Ct negativos (color rojo) indican que el gen se encuentra sobreexpresado en la condición Péptido 2+3 respecto a la condición Basal. Los resultados de $\Delta\Delta$ Ct positivos (color azul) indican que el gen se encuentra reprimido en la condición Péptido 2+3 respecto a la condición Basal.

Tabla 38. Comparación Péptido 2+3 vs Olea.

Gen-sonda	Media Δ Ct Péptido 2+3	Desviación estándar Δ Ct Péptido2+3	Media Δ Ct Olea	Desviación estándar Δ Ct Olea	$\Delta\Delta$ Ct Péptido2.3-Basal	p-valor ajustado
ADAM28-Hs00248020_m1	20,22	1,37	17,89	0,68	2,33	3,72E-02
APOE-Hs001711168_m1	21,49	1,07	18,50	1,66	2,99	1,91E-02
CAMK1-Hs00269334_m1	20,67	1,01	17,53	0,47	3,14	3,45E-03
CD36-Hs00354519_m1	20,49	1,63	17,64	1,32	2,85	2,79E-02
CD86-Hs01567025_m1	21,03	1,05	17,67	0,74	3,36	2,82E-03
FAAH2-Hs00415899_m1	19,16	0,85	21,34	1,19	-2,18	4,99E-02
FCN1-Hs00157572_m1	21,01	0,72	17,68	2,25	3,33	1,91E-02
FPR3-Hs01574392_m1	19,56	1,81	14,64	1,41	4,93	1,01E-03
FUCA1-Hs00609173_m1	20,79	0,84	15,61	0,90	5,18	5,84E-05
GAA-Hs01089838_m1	20,25	1,90	17,28	0,26	2,97	1,91E-02
GDE1-Hs00213347_m1	20,44	0,66	18,34	0,65	2,10	3,24E-02
GPNMB-Hs01095669_m1	20,58	0,91	13,34	0,86	7,24	8,23E-07
IL6-Hs00985639_m1	15,04	0,81	18,95	3,43	-3,91	2,97E-02
LGMN-Hs00271599_m1	19,91	0,72	15,70	0,71	4,22	3,32E-04
LRP1-Hs00233856_m1	20,74	1,04	17,22	0,53	3,52	1,56E-03
ME1-Hs01554892_m1	21,31	1,01	18,29	0,41	3,02	4,16E-03
MPEG1-Hs00909102_s1	17,53	0,99	14,44	1,90	3,09	1,97E-02
MYOF-Hs00203853_m1	20,57	1,15	16,96	0,82	3,60	1,99E-03
PI4K2A-Hs00218300_m1	19,67	1,48	17,13	0,70	2,54	2,79E-02
PSAP-Hs01551096_m1	15,04	0,46	13,02	0,59	2,02	3,31E-02
PTGS2-Hs00153133_m1	15,82	1,09	19,41	2,26	-3,59	1,58E-02
RNASE1-Hs00379274_m1	20,78	0,77	16,51	1,11	4,27	4,31E-04
SEMA6B-Hs00220339_m1	18,22	1,44	15,10	1,05	3,11	1,22E-02
SPINK1-Hs00162154_m1	20,42	1,20	17,75	1,30	2,67	2,59E-02
ST14-Hs01058386_m1	20,57	0,86	17,29	1,12	3,29	3,95E-03
STAB1-Hs00248439_m1	20,13	0,54	16,72	0,80	3,41	1,56E-03
TFPI2-Hs00197918_m1	17,63	0,21	20,35	1,63	-2,71	1,97E-02
TGFBI-Hs00932747_m1	19,34	0,54	14,91	1,32	4,44	4,10E-04
TLR4-Hs00152939_m1	21,43	1,03	18,26	1,38	3,17	9,91E-03
UBASH3B-Hs00262721_m1	19,82	1,57	17,10	0,61	2,73	2,00E-02

Los resultados de $\Delta\Delta$ Ct negativos (color rojo) indican que el gen se encuentra sobreexpresado en la condición Péptido 2+3 respecto a la condición Olea. Los resultados de $\Delta\Delta$ Ct positivos (color azul) indican que el gen se encuentra reprimido en la condición Péptido 2+3 respecto a la condición Olea.

Tabla 39. Comparación Péptido 10+12+13 vs Péptido 2+3.

Gen-sonda	Media ΔCt Péptido 10+12+13	Desviación estándar Péptido 10+12+13	Media ΔCt Péptido 2+3	Desviación estándar Péptido 2+3	ΔΔCt Péptido 10+12+13- Péptido 2+3	p-valor ajustado
ABHD2-Hs00199684_m1	15,33	0,71	17,66	1,41	-2,33	3,73E-03
APOE-Hs00171168_m1	18,32	2,05	21,49	1,07	-3,18	1,24E-03
CAMK1-Hs00269334_m1	17,47	1,98	20,67	1,01	-3,19	9,82E-04
CCL20-Hs00171125_m1	20,44	0,74	18,23	1,16	2,21	3,96E-03
CCL22-Hs99999075_m1	18,64	2,1	15,64	1,03	3	2,12E-03
CD36-Hs00354519_m1	17,63	1,17	20,49	1,63	-2,86	1,67E-03
CD84-Hs00174668_m1	17,68	0,69	19,63	0,92	-1,95	6,75E-03
CXCL1-Hs00236937_m1	16,83	4,06	11,61	0,56	5,22	4,76E-04
DAB2-Hs01120074_m1	18,92	0,22	20,81	1,23	-1,89	9,65E-03
EBI3-Hs01057148_m1	21,06	0,5	19,03	1,1	2,02	5,79E-03
FCN1-Hs00157572_m1	17,05	1,19	21,01	0,72	-3,96	9,63E-06
FPR3-Hs01574392_m1	14,26	0,51	19,56	1,81	-5,3	8,20E-07
FUCA1-Hs00609173_m1	15,94	1,13	20,79	0,84	-4,84	5,78E-07
GPNMB-Hs01095669_m1	13,59	1,14	20,58	0,91	-6,99	1,68E-09
IL1A-Hs00899848_m1	19,6	1,28	17,65	0,56	1,95	9,60E-03
IL1B-Hs99999029_m1	14,79	1,96	11,25	0,68	3,54	2,51E-04
IL24-Hs01114274_m1	19,74	1,63	16,79	1,48	2,95	1,87E-03
IL2RA-Hs00907777_m1	20,69	0,59	18,4	1,63	2,28	5,70E-03
IL6-Hs00985639_m1	19,41	2,06	15,04	0,81	4,36	3,43E-05
ITGB8-Hs01110394_m1	20,27	1,12	18,18	0,64	2,09	5,15E-03
LGMN-Hs00271599_m1	16,46	0,46	19,91	0,72	-3,45	1,42E-05
LRP1-Hs00233856_m1	17,65	0,6	20,74	1,04	-3,1	1,17E-04
ME1-Hs01554892_m1	18,14	1	21,31	1,01	-3,17	1,58E-04
MIR155HG-Hs01374569_m1	20,9	0,52	18,69	0,59	2,2	1,58E-03
MPEG1-Hs00909102_s1	14,89	1,68	17,53	0,99	-2,65	2,78E-03
MYOF-Hs00203853_m1	17,13	1,22	20,57	1,15	-3,44	1,21E-04
PSAP-Hs01551096_m1	13,22	0,5	15,04	0,46	-1,82	6,03E-03
PTGS2-Hs00153133_m1	20,17	1,05	15,82	1,09	4,35	3,93E-06
RNASE1-Hs00379274_m1	17,42	0,71	20,78	0,77	-3,36	3,09E-05
SEMA6B-Hs00220339_m1	14,98	0,59	18,22	1,44	-3,23	1,74E-04
SERPINB2-Hs01010736_m1	14,82	2,58	10,81	0,56	4,01	2,85E-03
SPINK1-Hs00162154_m1	17,42	0,52	20,42	1,20	-3,00	2,36E-03
ST14-Hs01058386_m1	18,02	1,54	20,57	0,86	-2,55	1,86E-02
STAB1-Hs00248439_m1	16,51	0,98	20,13	0,54	-3,61	3,52E-04
TFPI2-Hs00197918_m1	20,76	0,46	17,63	0,21	3,12	5,58E-04
TGFBI-Hs00932747_m1	14,60	0,80	19,34	0,54	-4,74	1,86E-05
TLR4-Hs00152939_m1	18,01	1,47	21,43	1,03	-3,41	2,16E-03
TREM1-Hs00218624_m1	20,09	0,23	18,17	1,30	1,91	4,83E-02

Los resultados de ΔΔCt positivos (color rojo) indican que el gen se encuentra sobreexpresado en la condición Péptido 2+3 respecto a la condición Péptido 10+12+13. Los resultados de ΔΔCt negativos (color azul) indican que el gen se encuentra reprimido en la condición Péptido 2+3 respecto a la condición Péptido 10+12+13.

Muchos de los genes que aparecen diferencialmente expresados son comunes en varias de las comparaciones planteadas (Tablas 36, 37, 38 y 39). Por ello, al hacer un estudio más exhaustivo, se comprobó que, en realidad, son 51 los genes que modifican su expresión con el Péptido 2+3 respecto al resto de los estímulos: ABHD2, ADAM28, APOE, CAMK1, C1QC, CCL20, CCL22, CD36, CD84, CD86, CXCL1, DAB2, DNMT1, EBI3, FAAH2, FCN1, FPR3, FUCA1, GAA, GDE1, GPNMB, IL1A, IL1B, IL2RA, IL6, IL24, INHBA, ITGB8, LGMN, LRP1, MPEG1, ME1, MIR155HG, MYOF, PIPI4K2A, PSAP, PTGS2, RNASE1, SEMA6B, SERPINB2, SPINK1, STAB1, ST14, TFPI2, TGF β 1, TLR4, TREM1, TREM2, UBASH3B, WNT5A y ZNF467. De estos genes, solo algunos se encuentran diferencialmente expresados en las 3 comparaciones. Por un lado, IL6, PTGS2 y TFPI2 están incrementados en la condición Péptido 2+3 respecto a las demás, mientras que los genes: APOE, CAMK1, CD36, FCN1, FPR3, FUCA1, GPNMB, LGMN, LRP1, ME1, MYOF, PSAP, RNASE1, SEMA6B, SPINK1, ST14, STAB1, TGFBI y TLR4 se encuentran reprimidos en esa misma condición.

A la vista de estos resultados, se reanalizaron únicamente los datos con los 51 genes con expresión diferencial estadísticamente significativa, utilizando nuevamente un modelo jerárquico no supervisado. Este análisis agrupó los *heat maps* tal y como aparece indicado en la Figura 32, demostrando que el Péptido 2+3, modula específicamente la expresión de esos genes (las muestras estimuladas con este Péptido se agrupan por un lado, mientras que las demás por otro).

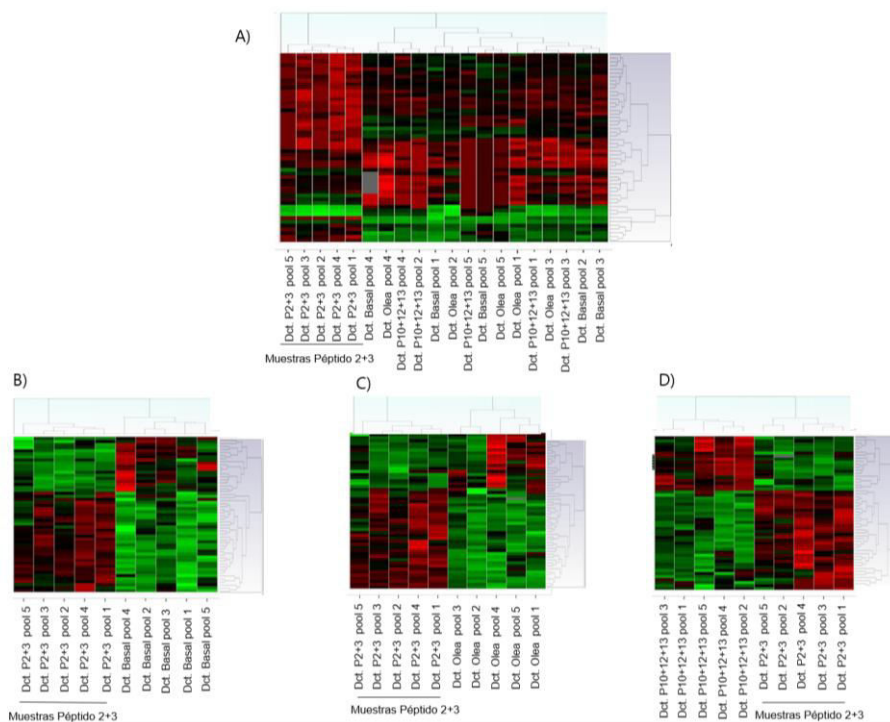


Figura 32. Heat maps de los 51 genes diferencialmente expresados. A) Heat map de todas las muestras (pools) del estudio. B) Heat map de las muestras estimuladas con el Péptido 2+3 (P2+3) y la muestras sin

estimular (Basal). C) *Heat map* de las muestras estimuladas con el Péptido 2+3 y las muestras estimuladas con Olea. D) *Heat map* de las muestras estimuladas con el Péptido 10+12+13 (P10+12+13) y estimuladas con el Péptido 2+3.

5.5 ESTUDIO FUNCIONAL DE GENES

Para definir rutas biológicas en las que están involucrados, los 51 genes con diferencias de expresión más relevantes, se analizaron desde un punto de vista funcional, usando la base de datos DAVID. El análisis estableció 5 agrupamientos principales (Tabla 40): 1. Genes que intervienen en la respuesta inmune, 2. Genes que intervienen en la endocitosis, 3. Genes relacionados con el factor de crecimiento epidérmico, 4. Genes relacionados con los lisosomas y 5. Genes relacionados con la cicatrización. Los genes que no pudieron ser agrupados bajo ningún epígrafe de los anteriores, se agruparon bajo el nombre de *Miscellaneous*. Algunos de los genes, debido a sus características funcionales, pertenecían a más de un grupo. El grupo que más genes alberga es el de respuesta inmune, que se dividió en varios subgrupos en función de sus implicaciones dentro del Sistema Inmunitario.

Tabla 40. Clasificación funcional de genes mediante el programa DAVID.

1. RESPUESTA INMUNE	Regulación positiva de Sistema Inmunitario	CD86, EBI3, C1QC, IL1B, IL2RA, IL6, TLR4
	Quimiotaxis	CCL20, CCL22, CXCL1, FPR3, IL1B, IL6
	Actividad de citocinas	EBI3, CCL20, CCL22, CXCL1, INHBA, IL1A, IL1B, IL24, IL6
	Respuesta a bacterias	CCL20, IL1B, IL6, PTGS2, STAB1, TLR4
	Regulación de la proliferación celular	CD86, EBI3, CXCL1, GPNMB, APOE, IL1A, IL1B, IL2RA, IL6, PTGS2
	Otros	FCN1, PI4K2A, TREM1, TREM2
2. ENDOCITOSIS		CD36, DAB2, FCN1, APOE, LRP1, STAB1
3. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO		ADAM28, ITGB8, LRP1, PTGS2, STAB1
4. LISOSOMA		FUCA1, GAA, LGMN, PSAP
5. CICATRIZACIÓN		CD36, IL1B, IL6, SERPINB2, TFPI2
6. <i>Miscellaneous</i>		CAMK1, CD84, FAAH2, DNMT1, GDE1, ME1, MIR155HG, MYOF, RNASE1, SEMA6B, SPINK1, ST14, TGFBI, UBASH3B, WNT5A, ZNF467

Por otro lado, para analizar las posibles interacciones interproteicas, se utilizó el programa STRING 9.0. El estudio mostró una red de interacciones proteicas en la que el núcleo central corresponde a proteínas con implicaciones funcionales en el S.I. (Figura 33).

PBMC se cultivaron previamente, durante 72 horas, en ausencia/presencia de los estímulos (Olea, Péptido 2+3, Péptido 10+12+13) (según se describe en el Apartado 4.3 de Materiales y Métodos).

La Figura 34 es un ejemplo representativo de los niveles de proteínas detectables para cada una de las condiciones experimentales estudiadas.

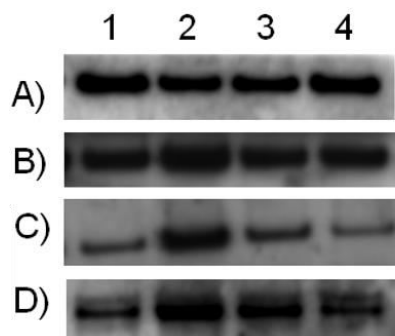
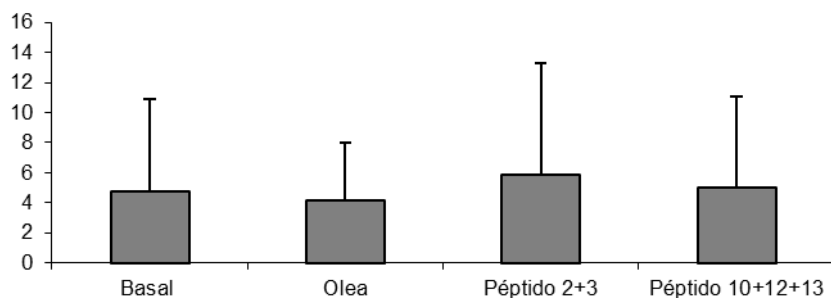


Figura 34. Ejemplo representativo de inmunodetección de proteínas mediante *Western-Blot*. Bandas de A) β -ACTINA, B) EBI3, C) FPR3 y D) TREM1 obtenidas para cada condición experimental. En todos los carriles se cargaron 10 μ g de proteína total, extraída de PBMC en las distintas condiciones: 1) Condiciones basales (sin estímulo), 2) Muestras estimuladas con Olea, 3) Muestras estimuladas con el Péptido 2+3, 4) Muestras estimuladas con el Péptido 10+12+13.

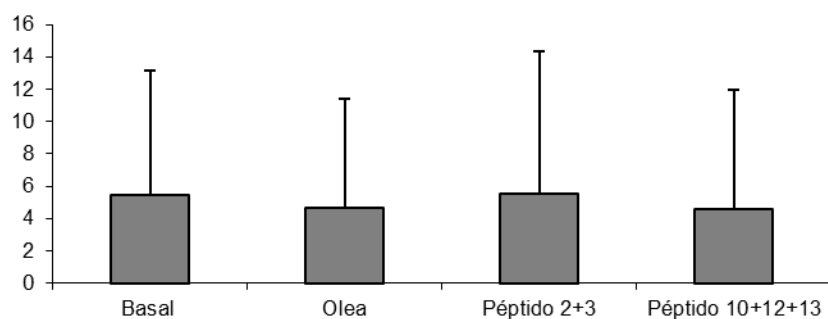
Con el fin de evaluar si los estímulos modifican la expresión de las proteínas analizadas, se cuantificaron los niveles de expresión de cada una de ellas, relativizándose respecto a la proteína utilizada como control de carga, la β -ACTINA (endógeno), mediante densitometrado de las bandas obtenidas en cada caso (según protocolo detallado en el Apartado 9.4). Este proceso se analizó en los 10 sujetos de estudio y se calculó la media aritmética, para cada una de las condiciones estudiadas. Los resultados obtenidos se indican en la Figura 35.

En ninguna de las proteínas estudiadas pudimos confirmar que las diferencias observadas a nivel de RNA se mantenían a nivel proteico, de una forma estadísticamente significativa.

A) EBI3



B) FPR3



C) TREM1

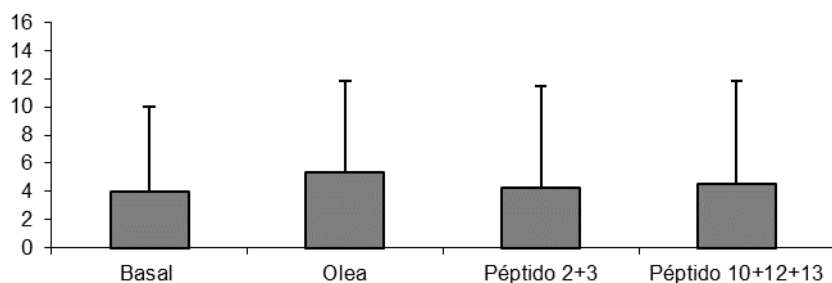


Figura 35. Niveles medios de expresión de EBI3, FPR3 y TREM1 relativizados frente a β -ACTINA. Cuatificación por densitometría de la expresión proteica de A) EBI3, B) FPR3, C) TREM1 para cada una de las condiciones experimentales planteadas, Basal, Olea, Péptido 2+3, Péptido 10+12+13 en 10 sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento. En ninguna de las comparaciones realizadas entre las condiciones experimentales se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

7 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN E INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE PBMC

7.1 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN

Los resultados obtenidos tanto en el estudio de citocinas como en el estudio de expresión génica, los cuales nos permitieron observar que, muchos de los genes modulados por los Péptidos modulaban, a su vez, genes con especial importancia en la regulación del S.I., así como, el hecho de saber que estos Péptidos son inmunogénicos pero no inducen la formación de anticuerpos IgE, nos hicieron plantear si estos mismos Péptidos podrían modular la respuesta proliferativa. Por este motivo, se analizó la proliferación que inducen Olea (respuesta alérgeno específica) y los Péptidos derivados de Ole e 1 en PBMC de sujetos no alérgicos (n=5) y alérgicos al polen de olivo sin tratamiento (n=8), según se detalla en el Apartado 10 de Materiales y Métodos. Una vez comprobada la eficacia de la técnica usando un control positivo de la respuesta proliferativa, PHA, y la viabilidad celular (observándose una horquilla de 85-90% de viabilidad celular), se calculó el índice de estimulación (I.E.), valor de absorbancia de cada condición respecto a la condición Basal.

En el caso de los sujetos no alérgicos, las muestras estimuladas con el Péptido 2+3 presentaron los mayores índices de estimulación aunque también la mayor desviación estándar ($1,67 \pm 1,94$), seguido de las muestras estimuladas con el Péptido 10+12+13 ($1,42 \pm 0,32$). El menor I.E. se observó en las muestras estimuladas con la combinación de Péptidos (Péptido 2+3 + Péptido 10+12+13) ($0,73 \pm 0,25$). Las diferencias estadísticamente significativas se señalan en la Figura 36 A. En los sujetos alérgicos los mayores índices de proliferación fueron los obtenidos para las condiciones Olea ($1,19 \pm 0,19$) y Péptido 10+12+13 ($1,21 \pm 0,36$) siendo estadísticamente significativos comparándolos con los estímulos Péptido 2+3 ($0,85 \pm 0,25$) y la combinación de Péptidos ($0,70 \pm 0,30$) (Figura 36 B).

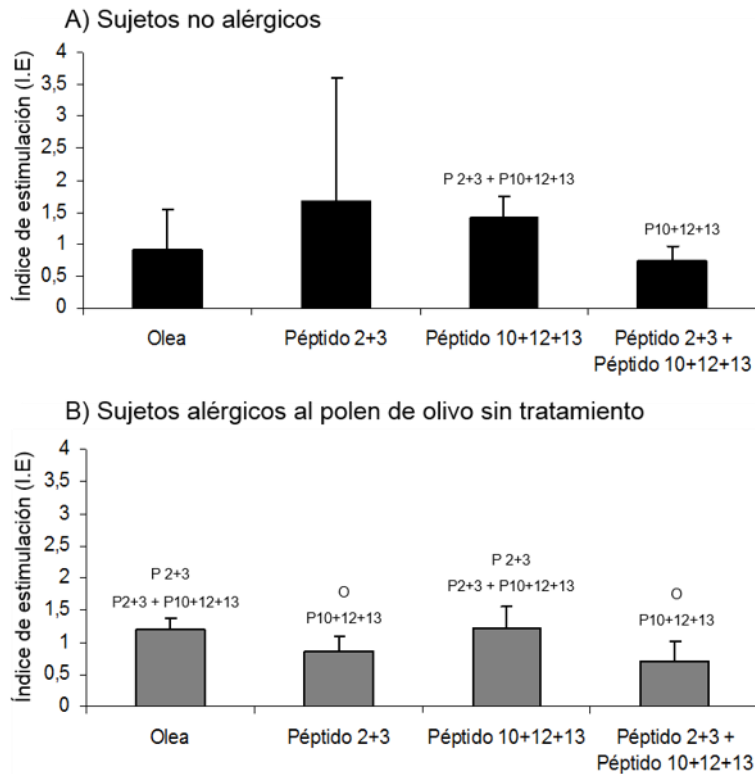


Figura 36. Índices de estimulación medios. A) Sujetos no alérgicos (n= 5). B) Sujetos alérgicos al polen de olivo (n= 8). Se representan los índices de proliferación medios obtenidos para cada condición experimental señalando las diferencias estadísticamente significativas (p -valor $\leq 0,05$): O (Olea), P 2+3 (Péptido 2+3), P 10+12+13 (Péptido 10+12+13) y P 2+3 + P 10+12+13 (Péptido 2+3 + Péptido 10+12+13).

7.2 ENSAYOS DE INHIBICIÓN

En estos mismos sujetos, se evaluó la capacidad de inhibir (revertir e impedir) la respuesta proliferativa inducida por el extracto completo de polen de olivo por parte de los Péptidos. En los ensayos de reversión se estimularon las células con el extracto completo de polen de olivo durante 24h (tiempo considerado óptimo como ya se comprobó en anteriores ensayos) y posteriormente, se incubaron con los Péptidos. Por otro lado, se quiso evaluar si los Péptidos podían impedir el desarrollo de la respuesta proliferativa específica de alérgeno. Para ello, primero se estimularon las células con los Péptidos y luego se incubaron con el extracto completo. Las condiciones de los ensayos, están detalladas en el Apartado 10 de Materiales y Métodos.

La Figura 37 muestra la capacidad de los Péptidos de inhibir la proliferación celular respecto a la inducida con Olea. En el caso de los sujetos no alérgicos, no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en ninguna de las condiciones experimentales planteadas (Figura 37 A). Sin embargo, en el caso de los sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento (Figura 37 B), el Péptido 2+3 parece inhibir, al menos en parte (alrededor de un 10%), la respuesta proliferativa

previamente establecida por el estímulo Olea (I.E.: $1,19 \pm 0,19$). Así, aunque los cambios producidos no son estadísticamente significativos, sí se observa una bajada de los índices de estimulación en las condiciones Olea 24h Péptido 2+3 (I.E.: $1,02 \pm 0,33$) y Olea 24h Péptido 2+3 + Péptido 10+12+13 (I.E.: $1,12 \pm 0,19$). El Péptido 10+12+13 no provoca esa inhibición.

En el caso de los ensayos de preestimulación con los Péptidos, se observó que, en las condiciones en las que interviene el Péptido 2+3 (Péptido 2+3-24h-Olea, I.E.: $0,78 \pm 0,26$ y Péptido 2+3 + Péptido 10+12+13-24h-Olea I.E.: $0,73 \pm 0,27$) se produce un descenso significativo en los I.E. en comparación con lo que sucede con el I.E. de Olea (I.E.: $1,19 \pm 0,19$) alrededor del 40% (Figura 37 B).

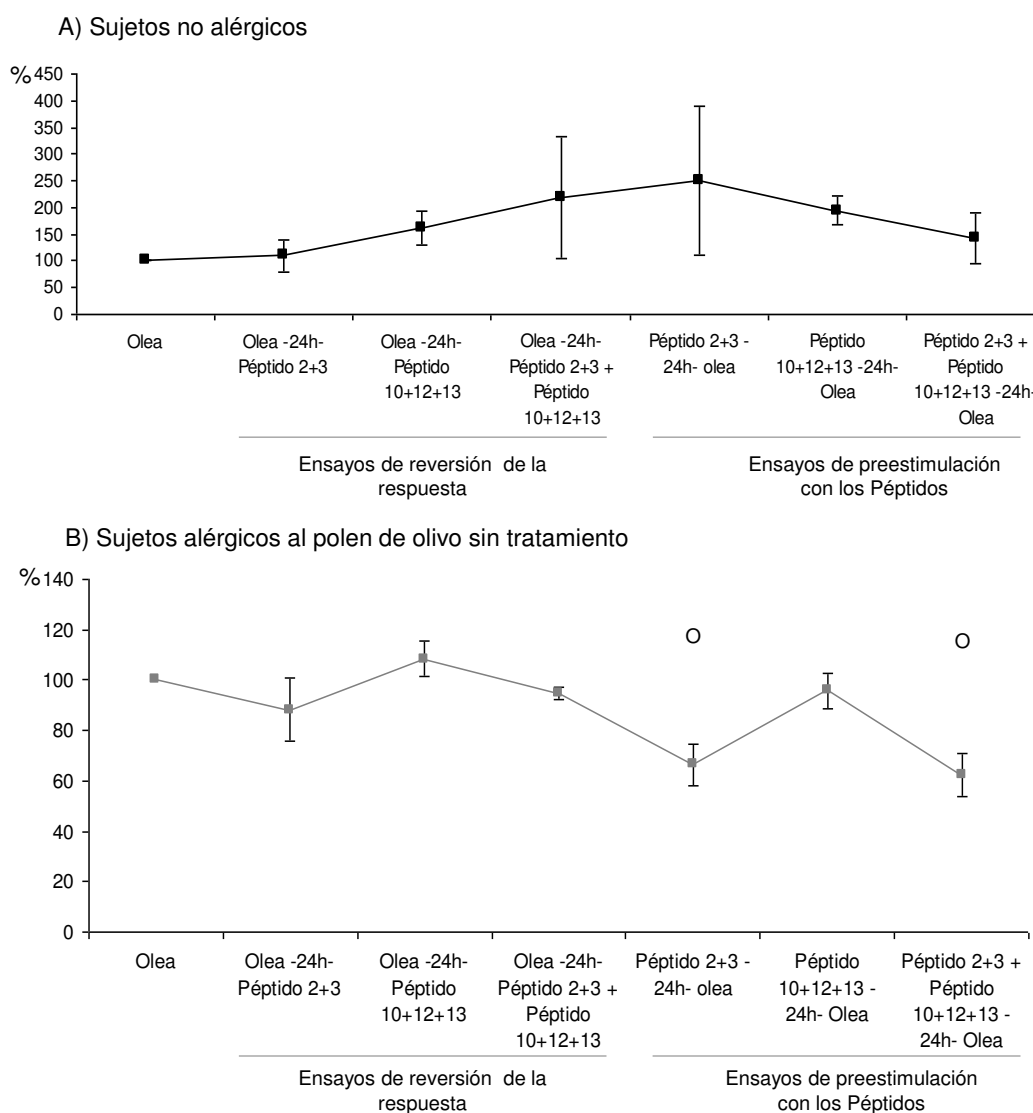


Figura 37. Porcentaje de proliferación celular obtenidos en los experimentos de inhibición de la respuesta frente a Olea (100% de proliferación). A) Sujetos no alérgicos (n=5), B) Sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento (n=8). Se indican como (O) los índices de estimulación (I.E.) estadísticamente diferenciales respecto al I.E. de Olea (p-valor $\leq 0,05$).

DISCUSIÓN

La mayoría de las sustancias a las que estamos expuestos son inocuas y generan una “no respuesta” o tolerancia en gran parte de la población. Sin embargo, en ciertos sujetos y bajo determinadas condiciones este estado de equilibrio puede alterarse, originándose una respuesta exacerbada del S.I., como ocurre en las enfermedades alérgicas (Akkoc T. *et al.*, 2011). Por ello, el tratamiento etiológico de estas enfermedades está orientado hacia el restablecimiento de la tolerancia perdida (Akdis C.A., Akdis M., 2011). En este sentido, durante los últimos años, se han multiplicado los esfuerzos con el fin de mejorar los tratamientos existentes (Jutel M., Akdis C.A., 2014; Focke-Tejkl M. *et al.*, 2014), mediante el desarrollo de nuevos tipos de vacunas, como por ejemplo, las vacunas basadas en alérgenos recombinantes, en hipoalérgenos o en secuencias de DNA. Una de las estrategias más interesantes son las vacunas basadas en péptidos (Creticos P.S., 2014), ya que ofrecen múltiples ventajas como la utilización de componentes definidos y específicos de alérgeno, lo que facilita la estandarización del tratamiento y reduce el riesgo de inducir nuevas sensibilizaciones en los sujetos tratados. Además, este tipo de vacunas permite combinar distintos péptidos en función de las necesidades de cada paciente, un avance más hacia la denominada Medicina Personalizada.

Este tipo de péptidos con potencial terapéutico están siendo muy estudiados en la actualidad, tanto en enfermedades de origen autoinmune (Elyaman W. *et al.*, 2011) como en alergias (Creticos P.S., 2014). Recientemente, se han calificado como “epítomos Treg” (De Groot A.S. *et al.*, 2008) o SPIRE (*Synthetic peptide immuno-regulatory epitopes*) (Creticos P.S., 2014) por su “promiscuidad” a la hora de unirse a moléculas del complejo de histocompatibilidad y su capacidad de inducir respuestas inmunorreguladoras, caracterizadas por una mayor secreción de IL-10 e inducción de células reguladoras.

En concreto, en la alergia al polen de olivo, distintos grupos de investigación nacionales e internacionales intentan desarrollar nuevas vacunas peptídicas que derivan del alérgeno principal utilizando distintas estrategias (Marazuela E.G. *et al.*, 2008a; Marazuela E.G. *et al.*, 2008b; Twaroch T.E. *et al.*, 2011). En nuestro laboratorio, llevamos años interesados en esta línea de investigación. Por ello, la presente Tesis Doctoral recoge los últimos avances conseguidos a este respecto. En ella se estudia, *in vitro*, la respuesta alérgica específica al extracto completo de polen de olivo (Olea) y el potencial terapéutico de péptidos derivados del alérgeno principal, Ole e 1, al ser utilizados como estímulos de PBMC de una población de estudio agrupada en 5 fenotipos clínicos distintos relacionados con la alergia al polen de olivo, valorando:

- Cambios en la secreción de citocinas (respuesta celular) y en la expresión génica inducida específicamente por los estímulos.

- La capacidad de estos péptidos de inhibir la respuesta de proliferación celular inducida por el extracto completo de polen de olivo.

La selección de los péptidos utilizados se basó en estudios previos del mapeo epitópico T de la molécula de Ole e 1. Por ello, se seleccionaron los Péptidos 10 (aa91-102), 12 (aa109-120) y 13 (aa119-130), definidos como inmunodominantes, ya que presentaron una mayor frecuencia de reconocimiento por parte de las células T de los sujetos alérgicos al polen de olivo que los individuos no alérgicos; y los péptidos 2 (aa11-22) y 3 (aa22-33) que fueron reconocidos, en su mayoría, por los sujetos no alérgicos y además, inducían una mayor secreción de IL-10 en los sujetos no alérgicos que los péptidos 10, 12 y 13 (Cárdaba B. *et al.*, 1998; Cárdaba B. *et al.*, 2007), motivos que apuntaban a que estos péptidos (2 y 3) podrían ser posibles epítopos inmunomoduladores. Asimismo, el hecho de que ninguno de los péptidos seleccionados indujera respuesta de anticuerpos (Cárdaba B. *et al.*, 1998), afianzó la idea de su posible utilidad en la terapia frente a la polinosis de olivo. Además, como a Ole e 1 se le considera marcador de sensibilización primaria de la familia de las oleáceas (Palomares O., *et al.*, 2006), estos péptidos podrían utilizarse para combatir este conjunto de enfermedades alérgicas.

Por otra parte, ya que múltiples estudios han relacionado la eficacia de las vacunas en la alergia con la carga antigénica ambiental (Wambre E. *et al.*, 2010; Aguerri M. *et al.*, 2012; Durham S.R. *et al.*, 2014), y con el fin de encontrar diferencias derivadas de la exposición, tanto la respuesta celular como los análisis de expresión génica, se evaluaron a dos tiempos independientes, durante y fuera de la época de polinización del olivo.

1 CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población estudiada en este trabajo, formada por sujetos de 5 grupos con una clínica diferente en relación a la respuesta alérgica frente al polen de olivo (sujetos no alérgicos, sujetos asintomáticos, sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo, sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento y sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con AIT), ha sido objeto de varias investigaciones desarrolladas por nuestro grupo, con las que intentamos esclarecer los mecanismos implicados en la respuesta tolerogénica (grupo de no alérgicos), de sensibilización alérgica (grupo de sujetos asintomáticos, sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo y sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento) y mecanismos implicados en la supresión de la respuesta alérgica (grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con AIT) (Aguerri M. *et al.*, 2012; Aguerri M. *et al.*, 2013).

Por un lado, se desarrollaron estudios para inmunofenotipar la población, desde un punto de vista celular (caracterización de la población de células Treg y secreción de citocinas de perfil Th1 y Th2) y humoral (secreción de anticuerpos relacionados con la respuesta alérgica (IgE) y anticuerpos con carácter antiinflamatorio (IgG4 e IgA) (Aguerri M. *et al.*, 2012).

Por otro lado, se realizó un estudio de la expresión génica a nivel global, mediante *microarrays*, que ya desde los análisis preliminares evidenciaron la correcta selección clínica de los sujetos participantes. Estudios de validación de los resultados globales, indicaron que un set de 35 genes: ADRB1, AKT1, ALOX5, APAF1, BAX, CD40, CD48, CD86, C3AR1, CRTAP, FPR3, GZMH, HLA-DRB1, HLA-DQB1, IL-10, ITGAL, ITGB7, ITGB8, LCK, LYN, MAPK13, NFTAC1, NLRP3, PRKACA, PRKACB, PTGER2, S1PR5, SELL, SMURF1, SOS1, SPN, TAGAP, TRIM37, VCAN y ZAP70 era capaz de discriminar las cinco condiciones clínicas, en comparaciones dos a dos, demostrando la utilidad de este tipo de estudios para encontrar nuevas herramientas de mejora en el diagnóstico y el tratamiento de la alergia (Aguerri M. *et al.*, 2013).

En cuanto a los resultados presentados en este trabajo, en primer lugar, se caracterizó la respuesta humoral (niveles de IgE total e IgE específicos frente al extracto de polen de olivo) de la población de estudio. Los anticuerpos IgE son las inmunoglobulinas mayoritariamente involucradas en la respuesta alérgica (Van Gasse A.L. *et al.*, 2015). Por lo general, los niveles circulantes son superiores en los individuos alérgicos comparados con los que no lo son. Su funcionalidad implica la unión a los FcεRI de la superficie de mastocitos, basófilos y eosinófilos y, con ello, el posible desarrollo de la sintomatología alérgica (Kalesnikoff J., Galli S.J., 2008). En este estudio, tanto durante como fuera del periodo de polinización, los niveles medios de IgE total (Figura 13) más elevados se encontraron en el grupo de los sujetos asintomáticos, seguidos de los sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con AIT y sin tratar. Como era de esperar, los niveles más bajos se obtuvieron en los individuos no alérgicos. En relación a estos resultados, cabe destacar que aunque los anticuerpos IgE suelen estar asociados a la respuesta alérgica, su presencia no indica el desarrollo de la enfermedad, más bien indicaría sensibilización, como ocurre en el caso de los individuos asintomáticos (donde se encontraron los valores más elevados). Además, la cuantificación de los niveles de IgE total carece de especificidad diagnóstica. Para ello, se miden los niveles de anticuerpos IgE específicos que identifican si un sujeto está sensibilizado a un determinado alérgeno y permiten valorar la propensión a una reacción alérgica tras una nueva exposición a él. A ese respecto, los sujetos con niveles más altos de anticuerpos IgE específicos frente al extracto de *Olea europaea* (Figura 14) fueron los sujetos alérgicos al polen de olivo, tanto tratados como sin tratar. Los demás grupos, mostraron niveles indetectables o extremadamente bajos (tanto durante

como fuera del periodo de polinización al alérgeno). Es obvio pensar que, los individuos alérgicos al polen de olivo presenten mayores niveles de anticuerpos IgE frente al extracto de *Olea europaea*. Los resultados más controvertidos se refieren a los sujetos alérgicos tratados con AIT, donde los niveles de anticuerpos IgE específicos son altos. En relación a este grupo, múltiples estudios proponen que uno de los mecanismos de acción de este tipo de terapia es el descenso gradual de los niveles de estos anticuerpos, observándose una duración del efecto durante meses o años (Gleich G.J. *et al.*, 1982; Van Ree R. *et al.*, 1997; Cavkaytar O. *et al.*, 2014). Sin embargo, otros muchos no lo observan o califican este descenso de los niveles de IgE como insignificante, tardío y sin repercusiones clínicas (Chen Z. *et al.*, 2011; Gokmen N.M. *et al.*, 2012; Kong W.J., Chen Wang Y., 2012; Moed H. *et al.*, 2013; Suarez-Fueyo A. *et al.*, 2014).

Uno de los mecanismos más importantes que permite valorar una buena respuesta a la inmunoterapia son los niveles de anticuerpos antiinflamatorios como los de IgG4 específicos de alérgenos (Müller U.R. *et al.*, 1989; Flicker S., Valenta R., 2003; Jutel M. *et al.*, 2003; Wachholz P.A., Durham S.R., 2004; Gokmen N.M. *et al.*, 2012). A este respecto, y aunque los resultados no se presentan en esta Tesis Doctoral, cabe destacar que fueron los pacientes alérgicos al polen de olivo tratados con AIT los que presentaron los niveles más elevados de anticuerpos IgG4 específicos frente al extracto completo de polen de olivo, en comparación al resto de los grupos de la población de estudio (Aguerre M. *et al.*, 2012). Los resultados globales de ese estudio, tanto de IgE como de IgG4 específica en los pacientes tratados, indican que la inmunoterapia produce un aumento de IgG4 específica sin disminuir los niveles de IgE específica. Por tanto, la principal diferencia respecto a los pacientes alérgicos sin tratamiento, no radica en una disminución de los anticuerpos IgE específicos, sino en el gran incremento de anticuerpos IgG4. Estos anticuerpos, actuarían bloqueando la respuesta alérgica mediante la captura de los alérgenos en lugar de hacerlo las moléculas de IgE unidas a las células efectoras impidiendo así, la activación de basófilos y mastocitos. Además, los anticuerpos IgG4 competirían con las células presentadoras de antígeno por la captación del alérgeno, dificultando su presentación a los linfocitos T (Aalberse R.C., Schuurman J., 2002; Moingeon P. *et al.*, 2006; Strait R.T. *et al.*, 2006; Van der Neut Kofschoten M. *et al.*, 2007). Todo ello se asociaría a la mejora clínica observada en estos pacientes.

2 MODULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE CITOCINAS DEBIDA A LOS ESTÍMULOS

Además de la secreción de anticuerpos IgE, la respuesta alérgica se caracteriza por una desviación de la respuesta inmune hacia un fenotipo de tipo Th2, con la producción mayoritaria de citocinas

como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 y una menor activación de células Th1 (secretoras de IFN- γ) (Larché M. *et al.*, 2006; Scadding G., 2014). La reversión de la respuesta, mediante inmunoterapia específica, debería provocar la disminución de secreción de citocinas de perfil Th2 y una desviación hacia la respuesta Th1 (con la característica producción de IFN- γ) (Schandane L. *et al.*, 1994; Shim J.Y. *et al.*, 2003), así como un restablecimiento de la tolerancia, debido, en parte, a una mayor secreción de citocinas reguladoras como la IL-10 o el TGF- β por parte de las células reguladoras (Akdis C.A. *et al.*, 1996; Akdis C.A. *et al.*, 1998; Francis J.N. *et al.*, 2003; Jutel M. *et al.*, 2003; Ling E.M. *et al.*, 2004; Nouri-Aria K.T. *et al.*, 2004; Jutel M. *et al.*, 2005; Akdis M., 2006; Larché M. *et al.*, 2006; Radulovic S. *et al.*, 2008; Canonica G.W. *et al.*, 2014).

Estudios previos han demostrado que, cuando se estimulan PBMC de sujetos alérgicos con el alérgeno causante de la sensibilización, estas células modifican la secreción de citocinas, aumentando las de perfil Th2 (respuesta específica de alérgeno) (Raulf-Heimsoth M., 2008; Urra J.M. *et al.*, 2014). Algunos trabajos muestran además, cómo péptidos derivados de esos alérgenos, modulan la respuesta hacia un fenotipo más tolerogénico, aumentando la secreción de citocinas de perfil Treg y/o Th1, en detrimento de la respuesta celular Th2 (Haselden B.M. *et al.*, 2001b; Oldfield W.L. *et al.*, 2001; Oldfield W.L. *et al.*, 2002). Por ello, en este estudio se realizaron unos ensayos experimentales con características similares. Así, se extrajeron las PBMC de los sujetos y se estimularon con el extracto alergénico de polen de olivo y con péptidos derivados del alérgeno principal (Ole e 1), con el fin de analizar los cambios inducidos en la secreción de citocinas en los 5 grupos clínicos planteados.

A nivel global, el análisis comparativo de citocinas (Tabla 20), tanto intergrupo como intragrupo no reveló ningún perfil diferencial de respuesta capaz de discriminar los 5 grupos clínicos ni en función del estímulo (Olea, Péptido 2+3 y Péptido 10+12+13) ni en función del periodo de recogida de las muestras (durante o fuera del periodo de polinización), debido principalmente a los bajos niveles detectados en la mayoría de las citocinas. Probablemente, porque el tiempo de cultivo no fue el idóneo, ya que se decidió en base al estudio de expresión génica, y pudo no ser el más adecuado para algunas de las citocinas analizadas. Los resultados más relevantes, se obtuvieron al comparar los datos del grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento con los del grupo de los sujetos no alérgicos (Tabla 21) y que, en teoría, son los más interesantes de analizar a la hora de evaluar una posible terapia en la alergia mediada por polen de olivo.

Comparando los resultados obtenidos en estos dos grupos se comprobó que, aunque los niveles fueron muy bajos, los sujetos no alérgicos presentaron, en general, mayores niveles de IL-2 e IFN- γ en todas las condiciones experimentales planteadas (Tabla 21). En cuanto a la influencia de los

distintos estímulos en los sujetos alérgicos, los resultados obtenidos hacen pensar que los estímulos Péptido 10+12+13 y Péptido 2+3 modulan la expresión de IL-2 (Tabla 22). Así, durante el periodo de polinización, el Péptido inmunodominante (Péptido 10+12+13) induciría una mayor secreción de esta citocina con respecto a la situación Basal. Mientras, fuera del periodo es el Péptido 2+3 (posibles epítomos inmunomoduladores) el que induce una menor secreción de esta citocina de activación/proliferación linfocitaria (Shevach E.M., 2012). Por su parte, al IFN- γ se le considera una de las citocinas características de la respuesta Th1, causante de la inhibición de la respuesta Th2, lo que se asocia a una respuesta tolerogénica, como ocurre en los sujetos sanos (no alérgicos) y en los pacientes alérgicos que recuperan la tolerancia específica de alérgeno (Tosca M.A. *et al.*, 2011; Sogut A. *et al.*, 2012). Sin embargo, en nuestro estudio, no observamos que los Péptidos aumenten la secreción de esta citocina en los sujetos alérgicos.

En relación a las citocinas de perfil Th2, tal y como se expone en la Tabla 21, los niveles de producción fueron, en general, muy bajos o incluso nulos (como en el caso de IL-13). Este estudio, como muchos otros (Gabrielsson S. *et al.*, 2001; Kurt E. *et al.*, 2010; Moverare R. *et al.*, 2000, Aguerri M. *et al.*, 2012) se ha realizado a partir de muestras de sangre periférica, por tanto, además de que el tiempo de estimulación puede no ser el más óptimo para estas citocinas, esos bajos niveles se pueden asociar también al hecho de que las células diferenciadas a Th2 están situadas preferentemente en los tejidos inflamados y no en la circulación, dando la falsa impresión de que las PBMC tienen una baja capacidad de producir citocinas tales como IL-4, IL-5 o IL-13.

Respecto a los niveles de IL-4, es difícil establecer conclusiones certeras. En todas las condiciones experimentales (ausencia/presencia de estímulos), los sujetos no alérgicos son los que presentaron niveles de secreción más altos, en comparación con los secretados por los sujetos alérgicos. La IL-4 es esencial en el desarrollo inicial y expansión de las respuestas de tipo Th2 y en la generación de anticuerpos IgE (Coyle A.J. *et al.*, 1995; Rankin J.A. *et al.*, 1996), aunque parece que no lo es en la fase efectora de la respuesta (Lewis C.C. *et al.*, 2009), lo que podría explicar los resultados obtenidos.

La IL-5 está relacionada con la inflamación y el reclutamiento de eosinófilos (Hamid Q. *et al.*, 1991; Humbert M. *et al.*, 1997; Mori A. *et al.*, 1997; Nair P. *et al.*, 2009). Al igual que los resultados obtenidos para la IL-4, fueron los sujetos no alérgicos los que secretaron los niveles más elevados. Por otra parte, los estímulos no afectaron a la secreción de esta citocina en el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo, de forma similar a lo ocurrido con la IL-13 (donde, por lo general, no se detectaron niveles de secreción).

En relación a todos estos resultados, cabe destacar que, estudios previos en los que se estimularon PBMC de pacientes asmáticos alérgicos con determinados alérgenos o péptidos derivados, también describieron la imposibilidad de establecer un patrón de secreción claro para las citocinas de perfil Th2 (Simms E. *et al.*, 2013).

Respecto al TNF- α , citocina de carácter proinflamatorio, los estímulos aumentaron sus niveles de secreción, tanto en los sujetos no alérgicos como en los que sí lo eran (Tabla 21). Algunos autores indican que la inmunoterapia podría inducir un aumento de la secreción de TNF- α (Jones S.M. *et al.*, 2009; Guida G. *et al.*, 2012). Sin embargo, la implicación de esta citocina en este ámbito es bastante controvertida (Cox L.S., 2009).

Los resultados con mayor relevancia de este estudio fueron los obtenidos para la IL-10 y el TGF- β (Figuras 15, 16, 17 y 18), citocinas con funciones inmunomoduladoras, involucradas por tanto en la respuesta tolerogénica frente a antígenos específicos (Palomares O. *et al.*, 2010; Palomares O. *et al.*, 2014).

Durante el periodo de polinización, las muestras estimuladas con el Péptido 2+3 (posibles epítomos inmunomoduladores), tanto en los sujetos no alérgicos como en los que sí lo son, secretaron los niveles más altos de IL-10 (asociado a una respuesta tolerogénica) (Figura 15). Sin embargo, fuera del periodo de polinización, las muestras de los pacientes alérgicos estimuladas con este Péptido, presentaron una bajada drástica de estos niveles. En esta situación, en contra de lo que cabría esperar, fue el extracto completo de polen de olivo el que provocó una mayor secreción de esta citocina (Figura 17). En relación al TGF- β , los sujetos no alérgicos secretaron niveles superiores de esta citocina que los producidos por los sujetos alérgicos en todas las condiciones experimentales planteadas, a excepción de lo que sucedió con el estímulo Péptido 2+3 fuera del periodo de polinización, donde esta relación se revierte de manera estadísticamente significativa (Figura 16). Todos estos datos ponen de manifiesto, por un lado, la importancia de IL-10 y TGF- β como mecanismos reguladores implicados en la respuesta alérgica al polen de olivo, como ya demostramos en estudios anteriores (Cárdaba B. *et al.*, 2007; Aguerri M. *et al.*, 2012) y, por otro, la importancia de valorar los niveles de carga polínica ambiental a la hora de establecer este tipo de estudio, ya que parece que en función de esta carga antigénica ambiental, los mecanismos reguladores implicados varían (Aguerrri M. *et al.*, 2012). Es posible que, por estos motivos, la eficacia de los tratamientos y la mejora de la sintomatología de los pacientes alérgicos dependan de la carga antigénica ambiental existente en el periodo que se lleva a cabo la terapia (Wambre E. *et al.*, 2010; Durham S.R. *et al.*, 2014).

Estudios que complementen estos datos, como por ejemplo, el estudio de secreción de anticuerpos IgE totales, IgE específicos, IgG1 e IgG4 para cada condición experimental, podría arrojar mayor claridad sobre el potencial uso de los péptidos analizados en la inmunoterapia. Además, los estudios de caracterización de la población, deberían completarse analizando lo que ocurre en los tejidos afectados, bien mediante biopsias o mediante el estudio de lavados nasales y broncoalveolares donde, teóricamente, los niveles de citocinas serán mayores, por ser los tejidos afectados.

3 MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA INDUCIDA POR LOS ESTÍMULOS

Las enfermedades alérgicas son enfermedades complejas y multifactoriales (Sibbald B. *et al.*, 1980; Hopp R.J. *et al.*, 1984), en las que los mecanismos involucrados se conocen solo parcialmente. El desarrollo de herramientas biotecnológicas como los *microarrays* de expresión génica, ha supuesto un gran avance para elucidar algunos de estos mecanismos, ya que permiten, de una manera sencilla y rápida, analizar la expresión de todos los transcritos de un sistema celular. En concreto, en este trabajo se utiliza esta técnica para estudiar los posibles genes implicados en la respuesta tolerogénica (grupo de sujetos no alérgicos), de sensibilización alérgica (grupo de asintomáticos, sujetos alérgicos no sensibilizados al polen de olivo y sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento) así como la supresión de la respuesta alérgica (grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con AIT). Estos estudios se realizaron, a nivel basal y estimulando PBMC de los sujetos con los estímulos mencionados anteriormente, para analizar los genes implicados en la respuesta alérgica específica (estímulo Olea), y el efecto de los péptidos específicos, en dos periodos de exposición ambiental al alérgeno.

3.1 A NIVEL GLOBAL

Los resultados, a nivel global, indicaron que los factores que producen mayor variación en la expresión génica de las muestras son, por este orden, el grupo clínico al que pertenecen los sujetos de estudio (con una variabilidad en 1.746 transcritos), seguido del estímulo al que son sometidas (563 transcritos diferencialmente expresados), (Figuras 20 y 21). Estos datos pusieron de manifiesto la correcta selección de los sujetos de estudio y su clasificación por grupos tal y como se evidencia en la Figura 22 (Aguerri M. *et al.*, 2013), así como la posibilidad de encontrar genes específicamente modulados por los estímulos (Figura 20). Sin embargo, parece que la carga ambiental del alérgeno existente en el momento de recogida de las muestras no es un factor importante que influya en

estos cambios (Figura 20). Estos datos se corroboraron mediante el estudio por PCA (Figura 23), donde el conjunto de todas las muestras se distribuye en dos grupos, las estimuladas con el Péptido 2+3 por un lado y todas las demás por otro. Hecho que evidencia, *a priori*, la capacidad de este Péptido de producir cambios de expresión génica. Sin embargo, en este estudio, las muestras no se agrupan en función del grupo clínico al que pertenecen ni a la cantidad de antígeno ambiental. En los PCA de cada uno de los grupos clínicos analizados por separado, se comprueba que en los pacientes alérgicos sin tratamiento, las muestras pueden clasificarse en dos grupos, en función de la presencia o no de estímulo. Mientras, en el grupo de alérgicos tratados con AIT, el Péptido 2+3 es el que delimita la separación de las muestras. Según los estadísticos consultados, no se obtuvo una separación clara para el resto de los grupos aunque sí lo puede parecer a nivel visual (Figura 24).

Para analizar el número de sondas génicas diferencialmente expresadas, se realizaron comparaciones entre los distintos grupos clínicos respecto al grupo de sujetos no alérgicos, para cada una de las condiciones experimentales planteadas. Según se indica en la Tabla 24, el menor número de sondas diferenciales se encontró en la comparación de los sujetos asintomáticos vs sujetos no alérgicos en la estimulación con Olea en las muestras recogidas fuera del periodo de polinización (108 sondas con diferencias de expresión). Por su parte, el mayor número de sondas diferenciales se encontró en la comparación de estos mismos grupos clínicos, en las muestras recogidas fuera de la polinización pero ante la estimulación con el Péptido 2+3 (7.624 sondas diferenciales). Sin embargo, estos resultados son preliminares, por lo que el número de sondas diferenciales podría no evidenciar diferencias de comportamiento verdaderamente existentes entre los grupos.

3.2 EN LOS SUJETOS ALÉRGICOS AL POLEN DE OLIVO SIN TRATAMIENTO Y LOS NO ALÉRGICOS

Debido a la complejidad del análisis y a los estudios previos de esta población, que ya indicaban que las mayores diferencias desde el punto de vista clínico, inmunológico y de expresión génica se encontraban entre los grupos de sujetos no alérgicos y los alérgicos al polen de olivo sin tratamiento a nivel basal (Aguerri M. *et al.*, 2012; Aguerri M *et al.*, 2013; Calzada D. *et al.*, 2015), se decidió estudiar con más profundidad únicamente el comportamiento de estos grupos. Estos hechos, junto con los resultados obtenidos a nivel de PCA, en los que se observó una importante separación entre las muestras estimuladas y sin estimular solo en los sujetos alérgicos (Figura 24), enfatizaron la idea de que los estímulos seleccionados podrían modificar la expresión génica en los pacientes alérgicos. Así, al comparar estos resultados con los obtenidos para los sujetos no

alérgicos, se podrían evaluar las respuestas específicas de alérgeno (estímulo Olea) y de los Péptidos, aportando información teóricamente útil sobre una posible reversión de la respuesta, hacia un fenotipo más tolerogénico.

Los resultados iniciales (Tabla 24 C) mostraron que las mayores diferencias de expresión génica entre el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento y el grupo de los sujetos que no lo eran, se encontraron a nivel Basal, fuera del periodo de polinización, con un total de 3070 sondas con expresión diferencial. Las menores diferencias se encontraron en la condición Péptido 10+12+13, durante el periodo de polinización, con 296 sondas diferenciales. Es decir, este Péptido parece normalizar la expresión génica de los sujetos alérgicos al polen de olivo. Sin embargo, al aplicar la corrección establecida, el número de sondas diferencialmente expresadas bajó drásticamente (Tabla 25), obteniendo solo unos pocos genes con expresión diferencial: en la condición Basal, solamente el gen MSR1 se expresa más en el grupo de los pacientes alérgicos en comparación con los sujetos no alérgicos. Este gen podría estar involucrado en distintas patologías de las vías respiratorias (Poole J.A. *et al.*, 2015) como el cáncer de pulmón (Hirayama S. *et al.*, 2012) y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Kaku Y. *et al.*, 2014). Actualmente, en nuestro laboratorio se está analizando la importancia de este gen en el desarrollo del fenotipo asma alérgica grave (datos aún no publicados).

En las comparaciones Olea vs Péptido 2+3, la mayoría de los genes diferencialmente expresados no tienen una asociación clara, al menos en la actualidad, con la respuesta inmunológica, a excepción de la defensina DEFB124, el gen CCDC132 (cuya expresión podría estar involucrada en la dermatitis atópica) (Matsumoto Y. *et al.*, 2010) y el gen IL20RB, alguno de cuyos polimorfismos se han asociado a un riesgo mayor de padecer psoriasis (Kingo K. *et al.*, 2008).

En relación a la bajada drástica del número de genes diferenciales, cabe destacar que, con frecuencia, en los estudios por *microarrays*, tras aplicar las múltiples correcciones necesarias, solo unos pocos genes, o incluso ninguno, tienen la suficiente potencia como para que el cambio en su expresión sea significativo. Este fenómeno se debe a que las diferencias son "modestas" en relación al ruido inherente a la tecnología de *microarrays*. Además, la principal utilidad de los *microarrays* no es estudiar los cambios de expresión de unos cuantos genes, sino evaluar cambios más generales ya que, por ejemplo, la alteración de la expresión en 20 veces de un solo gen en una ruta biológica puede no ser tan relevante como que el 20% de los genes participantes presenten pequeños cambios, no estadísticamente significativos (Subramaniana A. *et al.*, 2005). Por estas razones y con el fin de racionalizar y conectar la gran cantidad de datos que se obtienen en estos ensayos con los ya conocidos, se utilizan bases de datos que agrupan los genes en rutas o vías

funcionales. Siguiendo ese esquema, los datos generados en este trabajo fueron analizados funcionalmente, utilizando dos de las bases más habituales: KEGG y GO (Tablas 26, 27 y 28).

El análisis de las vías funcionales revela que, tanto por la base de datos KEGG como por GO, los pacientes alérgicos muestran un mayor número de vías sobreexpresadas que el grupo de los sujetos no alérgicos (Tablas 26 y 27). El mayor número de vías KEGG diferenciales se encontró en la condición Basal fuera del periodo de polinización, mientras que con la base de datos GO (procesos redundantes) las mayores diferencias se encontraron a nivel Basal durante el periodo de polinización. El menor número de vías diferenciales, tanto por GO como por KEGG, se encontraron en la estimulación de las PBMC con Olea durante el periodo de polinización (Tablas 26 y 27).

En este estudio, se realiza un análisis más detallado de los resultados obtenidos para la base de datos KEGG y no tanto para los obtenidos por GO ya que, aunque los términos GO también se han utilizado como herramienta de clasificación de los genes, su discusión es más complicada, por su visión más general. Además, en muchas de las comparaciones realizadas en este estudio, el número de procesos biológicos GO diferenciales es muy elevado (del orden de cientos de procesos modificados: Tabla 27), lo que hace imposible su discusión en este trabajo. Una manera más completa de analizar los resultados sería comparar los resultados obtenidos mediante las dos bases de datos. Sin embargo, esta comparación es compleja, ya que los procesos biológicos GO involucran varias rutas funcionales KEGG que suelen interactuar.

El número de vías KEGG diferenciales entre los pacientes alérgicos al polen de olivo y los sujetos no alérgicos (Tabla 26 y Figuras 25 y 26) son similares si comparamos lo que sucede entre los distintos periodos de exposición al alérgeno para cada condición experimental, a excepción de lo que ocurre en la estimulación con el extracto completo de polen de olivo (Olea). En esta condición, durante el periodo de polinización, no se encontraron vías funcionales diferenciales entre los dos grupos de estudio, a pesar de ser intuitivamente una de las que mayor número de vías funcionales diferenciales podría tener. Una posible explicación podría ser que la sobreexposición al alérgeno (estimulación con Olea cuando están expuestos ambientalmente) parece inducir algún mecanismo de tolerancia, produciendo la normalización de la expresión génica de los pacientes alérgicos con respecto a los sujetos no alérgicos, aunque para obtener conclusiones certeras se necesitaría un estudio más específico.

Los resultados más interesantes se obtuvieron fuera del periodo de polinización. Además, es en la época en la que generalmente se comienza a administrar la inmunoterapia en el ámbito clínico. Por ello, parece ser el periodo óptimo para evaluar el potencial inmunoterapéutico de los Péptidos. En

este periodo, el mayor número de vías diferenciales, entre el grupo de los sujetos no alérgicos y los alérgicos, se encontraron a nivel Basal (32), seguido de las muestras estimuladas con Olea (23) y el Péptido 10+12+13 (18), mientras que las menores se encontraron con la estimulación del posible epítipo inmunomodulador (Péptido 2+3) donde solo se encontraron 10 vías diferenciales, (Tabla 26, Figura 26).

De forma predecible, muchas de las rutas diferenciales encontradas en este estudio están directamente relacionadas con la respuesta inmune, tanto con la inmunidad innata como con la inmunidad adquirida. Las vías funcionales con mayor relevancia biológica se comentan a continuación.

En la respuesta inmune, existen rutas y genes relacionados con la modulación de los riesgos ambientales, como la "Ruta de señalización de los receptores tipo *Toll*" que incluye genes de componentes de la respuesta innata, como los TLR, que modulan la respuesta inmunológica, aumentando la secreción de citocinas proinflamatorias y la expresión de moléculas coestimuladoras que producen la activación de células inmunitarias (Dębińska A., Boznański A., 2014; Maheaswari R. *et al.*, 2014). En nuestro estudio, esta vía se encuentra sobreexpresada en los sujetos alérgicos respecto a los no alérgicos en las condiciones Basal y estimulación con Olea, pero no con el Péptido 2+3 ni con el Péptido 10+12+13.

Uno de los primeros mecanismos que se necesitan para la activación del S.I., que relaciona la inmunidad innata con la adquirida, es el procesamiento y presentación de los antígenos (Soyer O.U. *et al.*, 2013). Bajo este epígrafe encontramos las vías KEGG "Presentación y procesamiento antigénico" y las de "Rechazo de aloinjerto", "Enfermedad injerto frente a huésped" y otras enfermedades autoinmunes como "Enfermedad tiroidea autoinmune", "Diabetes mellitus tipo I" o "Lupus eritematoso sistémico" en las que el complejo principal de histocompatibilidad HLA (de tipo I o II) presenta los antígenos a los receptores TCR de linfocitos CD8⁺ en células T citotóxicas; a los receptores KIR, en células NK o a los receptores TCR de los linfocitos CD4⁺ (en relación a la naturaleza del antígeno).

El mayor número de vías diferenciales involucradas en el procesamiento y presentación de antígenos, las encontramos a nivel Basal y bajo la estimulación con Olea y el Péptido 10+12+13, pero no encontramos ninguna con la estimulación del posible péptido inmunomodulador, el Péptido 2+3 (Figura 26).

El último término de la presentación antigénica tiene como objetivo la activación de células involucradas en la respuesta inmune mediante, por ejemplo, la activación de la ruta de "Señalización del receptor de células T" como sucede en este trabajo en los sujetos alérgicos, bajo la estimulación de Olea y la "Citotoxicidad mediada por células NK", en la que los genes participantes en la vía se encuentran sobreexpresados en los sujetos alérgicos en la condición Basal y Olea. Además, el reconocimiento del alérgeno por parte de las inmunoglobulinas, desencadena la activación de la "Ruta de señalización del receptor de células B" como ocurre en el caso de la condición Basal y de la estimulación con Olea. Esta vía de activación no se encuentra diferencialmente expresada en el caso de las estimulaciones con los Péptidos 2+3 y 10+12+13, lo que evidencia aún más su posible implicación en la modulación del S.I.

Todas estas activaciones celulares provocan entre otros procesos, la migración de células al tejido afectado. Bajo esta premisa, en nuestro estudio, encontramos vías KEGG diferenciales como la "Regulación del citoesqueleto de actina" y otras como "Migración transendotelial de leucocitos", "Moléculas de adhesión celular" y "Adhesión focal". En ellas participan genes que codifican proteínas encargadas del reclutamiento celular en zonas locales: quimiocinas y moléculas de adhesión celular (CAM), como las integrinas, las cuales regulan la migración de los leucocitos, su activación y supervivencia, además de participar en la reorganización patológica de los tejidos (remodelado tisular y fibrosis).

La consecuencia última de todos estos procesos, es la alteración de la respuesta tolerogénica, que viene determinada por la aparición de enfermedades. La que mayor importancia tiene en este estudio es el asma, por ser una de las manifestaciones clínicas más graves de la respuesta alérgica. Esta vía "Asma" (Figura 27) se encuentra sobreactivada en los pacientes alérgicos, en comparación con los sujetos no alérgicos, en las estimulaciones Olea (extracto alérgico completo) y Péptido 10+12+13 (epítomos inmunodominantes), es decir, estos estímulos aumentan la expresión de muchos genes involucrados en esta vía en los pacientes alérgicos. Esta vía no se sobreexpresa ni a nivel Basal ni bajo la estimulación con el Péptido 2+3, lo que refuerza aún más su potencial inmunomodulador en la respuesta alérgica al polen de olivo.

Los resultados, además de aportar información esperable, como la implicación del S.I. en la respuesta alérgica, indican la implicación de otras vías KEGG que, *a priori*, no están involucradas en la respuesta alérgica aunque muchos de los genes participantes sí lo están.

Las vías "Infección por *E. coli* patogénica" y "EPEC" contienen genes relacionados con la adhesión celular, receptores tipo *Toll* y reorganización del citoesqueleto celular, vías que aparecen

sobreexpresadas en los pacientes alérgicos en todas las condiciones experimentales a excepción del Péptido 2+3.

La vía "Apoptosis" ha sido muy relacionada con los mecanismos de respuesta que ocurren en los sitios de inflamación alérgica y el remodelado tisular. Se ha descrito una disminución de rutas relacionadas con apoptosis en pacientes tratados con inmunoterapia para alérgenos de cacahuete (Jones S.M. *et al.*, 2009). Sin embargo, otros estudios relacionan la eficacia de la inmunoterapia con el aumento de la apoptosis de los linfocitos T (Guerra F. *et al.*, 2001). En nuestro estudio, no la encontramos sobreexpresada en los pacientes alérgicos con la estimulación de los Péptidos 2+3 y 10+12+13 pero sí en las condiciones Basal y Olea.

La vía de "Señalización intracelular Notch" es uno de los principales mecanismos de comunicación célula-célula que controlan múltiples procesos de diferenciación celular durante la vida embrionaria y adulta. Entre otras muchas implicaciones, se ha visto que regula la diferenciación de células presentes en la mucosa, y parece estar involucrada en la remodelación del tejido en la patología asmática (Guseh J.S. *et al.*, 2009; Guibas G.V. *et al.*, 2013). Esta vía se sobreexpresa con los estímulos Péptido 2+3 y Péptido 10+12+13 en los sujetos alérgicos respecto a los que no lo son.

Por otra parte, se ha comprobado que los procesos de ubiquitinización controlan aspectos básicos de la respuesta inmune: la inducción de la tolerancia, mediando la supresión de las respuestas Th (Liu Y.C., 2004; Liu Y.C., 2007) y en la activación y diferenciación celular características de las enfermedades alérgicas y autoinmunes. Los últimos estudios relacionados proponen que un mayor conocimiento de estos procesos de ubiquitinización, podría servir para mejorar las aproximaciones terapéuticas en este tipo de enfermedades (Park Y *et al.*, 2014). En nuestro estudio, hemos encontrado que los sujetos alérgicos sobreexpresan esta vía en ausencia de estimulación, que se normaliza con los distintos estímulos utilizados.

Tampoco están aparentemente relacionadas con la respuesta inmunitaria una serie de vías vinculadas con el metabolismo energético de la célula, como la "Fosforilación oxidativa", "Glucólisis/gluconeogénesis", "Ciclo del citrato", "Metabolismo de fructosa y manosa", "Metabolismo de esfingolípidos", "Ruta de las pentosas fosfato" y "Metabolismo del glutatión", entre otras (todas ellas sobreexpresadas en los pacientes alérgicos en alguna de las distintas condiciones experimentales). Varios trabajos constatan la importancia de estas rutas en las contracciones del músculo liso y la hipoxia provocada en desórdenes asmáticos (Kroeger E. *et al.*, 1971; Xu Y.D. *et al.*, 2010; Zhao W., Guenard H., 1994). En este estudio no se han utilizado células de pulmón o mucosa, sino PBMC, pero algunas de las enzimas involucradas en estos procesos,

también poseen funciones no relacionadas con el metabolismo, como son la regulación transcripcional, la estimulación de la motilidad celular y la regulación de la apoptosis (Kim J.W., Dang C.V., 2005).

Por otra parte, en este estudio aparecen diferencialmente expresadas algunas vías relacionadas con el Sistema Nervioso y que, *a priori*, podría parecer que están poco relacionadas con la respuesta alérgica. Sin embargo, cada vez hay más evidencias de la estrecha y compleja relación que existe entre el S.I. y el Sistema Nervioso. Un buen ejemplo de esta interacción es la vía KEGG "Interacción de ligandos-receptores neuroactivos" (Figura 28), la cual se encuentra reprimida en los pacientes alérgicos en las muestras sin estimular y en las estimuladas con Olea. En esta vía participan genes y mediadores implicados en los dos Sistemas como por ejemplo:

- Receptores acoplados a proteínas G (GPCR) que transducen una gran variedad de señales que permiten a la célula establecer comunicaciones inter- e intracelulares. En el S.I., los GPCR influyen en la inmunidad innata y adaptativa (Walker J.K.L. *et al.*, 2011; Mayr B. *et al.*, 2001).
- Neurotransmisores como la histamina, producida por basófilos y mastocitos, que incrementa la permeabilidad de los capilares permitiendo su entrada a los tejidos y provocando los síntomas alérgicos clásicos, o la acetilcolina, necesaria para la contracción de las vías respiratorias, que sucede en los sujetos asmáticos.
- Péptidos como las anafilotoxinas C3a y C5a, que forman parte del Sistema del Complemento. Las anafilotoxinas son potentes mediadores inflamatorios que regulan la vasodilatación, la contracción del músculo liso, la producción de histamina, la migración de células inmunes, etcétera. Una producción alterada de C3a se asocia a la patología asmática y se han identificado polimorfismos en C3/C3aR involucrados en esta enfermedad (Hasegawa K. *et al.*, 2004). El neuropéptido Y (NPY), que actúa a través de receptores GPCR, tiene un papel regulador en mecanismos relacionados con el Sistema Nervioso y el S.I. (Bedoui S. *et al.*, 2003), con un rol destacable en enfermedades de las vías respiratorias (Groneberg D. A. *et al.*, 2004).
- Prostanoides que incluyen moléculas muy conocidas en los desórdenes alérgicos como las prostaglandinas (PG) y los tromboxanos (TBX). Ambas son sintetizadas en la vía de la ciclooxigenasa (COX) a partir del ácido araquidónico. Las prostaglandinas son broncoconstrictoras y vasodilatadoras, además atraen a los leucocitos a la zona de

inflamación (Boyce J.A. *et al.*, 2008). También son potentes agentes de los nervios sensoriales. Tienen sus receptores G específicos en las neuronas sensoriales, que activan vías de señalización, aumentando la hipersensibilidad y que, a su vez, activan otras vías de sinapsis (Richardson J. D., Vaski M.R., 2002). El miembro más importante de los tromboxanos (TXA₂) actúa en la contracción del músculo liso, en la activación de respuestas inflamatorias endoteliales y en la agregación plaquetaria (Ricciotti E. *et al.*, 2011).

Otras vías que están sobreexpresadas en los sujetos alérgicos, en alguna de las condiciones experimentales estudiadas, se relacionan también con el Sistema Nervioso, como son las vías "Enfermedad de Huntington", "Enfermedad de Parkinson", "Enfermedad de Alzheimer", y la "Esclerosis lateral amiotrófica". Estas vías incluyen genes relacionados con el estrés oxidativo (Ooi J. *et al.*, 2014; Gaspar A. *et al.*, 2015) como la acumulación de especies reactivas de oxígeno, que influyen también en enfermedades crónicas como el asma (Holguin F., 2013).

Por último, cabe destacar que, a pesar de la gran información que aporta, la agrupación funcional KEGG tiene ciertas limitaciones, como la posibilidad de sobrerrepresentar ciertas rutas, por varios motivos: hay genes involucrados en un gran número de vías y por tanto, con más posibilidades de ser incluidos en alguna de ellas. También pueden priorizarse rutas con genes que ocupan las regiones mejor cubiertas por el *microarray*. Además, existe un sesgo intrínseco al método de clasificación, que es no considerar genes cuya función se desconoce y que están representados en el *microarray* (Elbers C.C. *et al.*, 2009). Asimismo, la anotación biológica tiene como ventaja dotar a los resultados de un valor biológico añadido, pero si se usa para guiar el análisis, puede desviar los resultados hacia el conocimiento biológico ya conocido. Por todo ello, aunque el concepto de clasificación funcional es muy útil, debe hacerse con precaución para no sesgar los resultados.

3.3 EN LOS SUJETOS ALÉRGICOS AL POLEN DE OLIVO SIN TRATAMIENTO

Para evaluar los cambios a nivel de expresión génica producidos por los estímulos, se compararon las sondas diferencialmente expresadas para cada condición experimental respecto a la situación Basal. En los estudios iniciales, sin aplicar la corrección del p-valor, es el Péptido 2+3, en las muestras recogidas durante el periodo de polinización, el que presenta un mayor número de sondas diferenciales (2.846). Por su parte el Péptido 10+12+13, en las muestras estimuladas durante el proceso de polinización, es el que presenta un menor número de sondas diferenciales (641) (Tabla 29).

Tras aplicar las correcciones establecidas, solo un gen presentó diferencias de expresión estadísticamente significativas. Es el gen FAM149A, que hasta la fecha no ha sido asociado con ninguna implicación en la respuesta alérgica o del S.I. y cuya expresión fue significativamente mayor en las muestras estimuladas con Olea que en la condición Basal durante el periodo de polinización.

Al igual que en el estudio comparativo entre el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento y no alérgicos, centramos el estudio en las vías funcionales definidas por KEGG y no por GO. Las principales vías diferenciales encontradas entre las distintas condiciones experimentales, no tienen una relación tan específica con el S.I. como ocurría en las comparaciones entre el grupo de sujetos alérgicos y no alérgicos. A excepción de la comparación Olea-Basal durante la polinización, donde la vía "Interacción de receptores citocina-citocina" (Figura 30) está sobreactivada en las muestras estimuladas con Olea, poniendo de manifiesto una posible activación de este sistema ante la estimulación con el extracto alérgico completo. El resto de las vías diferenciales en estas comparaciones se relacionan con la señalización celular: "Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos", "Vía de señalización fosfatidilinositol"; con procesos intracelulares: "Ribosoma"; y procesos relacionados con el metabolismo: "Fosforilación oxidativa" y "Metabolismo de piruvato" (Tabla 31).

Por último cabe destacar que, aunque el desarrollo de la tecnología de *microarrays* ha significado un gran avance en las investigaciones biomédicas, todavía cuenta con algunos problemas:

- No hay criterios estandarizados en relación a la toma de muestras, análisis, validación y recolección de datos.
- El alto coste de la técnica, que suele implicar que el número de réplicas o muestras analizadas sea normalmente bajo, lo que conlleva el riesgo de obtener resultados incorrectos, o válidos y útiles solo para un pequeño set de pacientes o sujetos, pero que no pueden ser generalizados. Por todo ello, se suelen realizar *pools* de muestras. Esta estrategia minimiza los costes y permite optimizar la cantidad de muestra, ya que en muchas ocasiones, como en este estudio, se dispone de poca cantidad. Sin embargo, podría provocar la pérdida de información, aunque existen investigaciones que demuestran que esta pérdida no tiene consecuencias relevantes (Faraggi D. *et al.*, 2003).
- Si la muestra es una mezcla celular (por ejemplo un tejido o, como en este caso PBMC), los datos reflejan una mezcla de la expresión de todas las células, pudiendo ser que tan solo

una parte refleje información relevante sobre la enfermedad o bien que esta información quede enmascarada. Por el contrario, el estudiar un solo tipo celular no es representativo de una enfermedad ya que, en la mayoría de los casos, están involucrados varios sistemas/poblaciones celulares (Benson M. *et al.*, 2004).

Por todo ello, los resultados obtenidos en este tipo de análisis requieren ser validados, mediante otras técnicas como por ejemplo, la qRT-PCR, en una población con mayor tamaño muestral.

4 POTENCIALES DIANAS TERAPÉUTICAS DEFINIDAS POR EL PÉPTIDO 2+3

En este trabajo, los análisis diferenciales de expresión génica por *microarrays* han generado un gran volumen de datos. Sin embargo, debido a la gran complejidad de los resultados, solo se seleccionaron para su validación, los obtenidos para el grupo de los pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento en las muestras recogidas fuera del periodo de polinización. Con esto lo que se pretendió fue asemejar lo que les sucede a estos pacientes al estar en contacto con el antígeno (en este caso los estímulos), y no una situación de sobreexposición como sería estudiar lo que ocurre durante el periodo de polinización. Este estudio, permitió ahondar aún más en el conocimiento de los Péptidos 2+3 y 10+12+13 y en su potencial inmunoterapéutico (variaciones en la expresión génica que indiquen cambios significativos en algún proceso de la activación del S.I. u otros mecanismos implicados en la mejora de la respuesta alérgica, lo que podría establecer nuevas formas de terapia para esta enfermedad).

Por ello, como punto de partida, se seleccionaron 189 genes relevantes (Tabla 35) de entre todas las comparaciones de la Tabla 29, intentando que los genes seleccionados representaran el mayor número posible de vías funcionales diferenciales. Además, siguiendo los criterios estadísticos establecidos, los genes debían de tener un *fold change* ≥ 2 o ≤ -2 y un p-valor significativo ($\leq 0,05$). Estos genes fueron analizados en una población mayor mediante qRT-PCR con el fin de validar su relevancia biológica.

Los resultados de las tarjetas microfluídicas arrojaron resultados claros. Así, la expresión de los 189 genes analizados permitió clasificar a las muestras en dos grupos: por un lado, las muestras estimuladas con el posible péptido inmunomodulador, Péptido 2+3, y todas las demás, por otro (Figura 31), lo que implica la capacidad de este Péptido de producir cambios específicos a nivel de expresión génica en este tipo de muestras.

Para analizar las diferencias de expresión entre las distintas condiciones experimentales, realizamos comparaciones dos a dos (Tablas 36, 37, 38 y 39). Así, comprobamos que no todos los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas en los *microarrays*, las presentaban en los ensayos de qRT-PCR, como ya lo habían manifestado estudios previos (Soref C.M. *et al.*, 2001; Gupta R.A. *et al.*, 2001, Chaib H. *et al.*, 2001). Esto se produce por diversas razones: los ensayos no se realizan al mismo tiempo, por lo que la estabilidad del mRNA puede cambiar (Ohme-Takagi M. *et al.*, 1993; Johnson M.A. *et al.*, 2000). A su vez, los *microarrays* pueden contener secuencias erróneas, hibridación cruzada, variantes génicas no reconocidas, etcétera, además de falsos positivos o genes que se expresen al azar, sin relación con el estudio, por el complejo análisis de datos que involucra a cientos de genes y; por último, los *microarrays* detectan un rango dinámico de expresión génica muy amplio en un solo ensayo, desde especies de mRNA muy poco abundantes, a genes endógenos (*housekeeping*) como el 18S, lo que puede implicar saturación en algunos casos, situación que no ocurre en la técnica de qRT-PCR.

Aplicando las correcciones establecidas de los p-valores, de todas las comparaciones posibles entre las cuatro condiciones experimentales (Tabla 36), solo en las que participa la condición Péptido 2+3 aparecen resultados estadísticamente relevantes. Del conjunto de las comparaciones, se comprueba que son 51 los genes que están específicamente modulados por el Péptido 2+3 (con expresión alterada en, al menos, una de las comparaciones): ABHD2, ADAM28, APOE, CAMK1, C1QC, CCL20, CCL22, CD36, CD84, CD86, CXCL1, DAB2, DNMT1, EBI3, FAAH2, FCN1, FPR3, FUCA1, GAA, GDE1, GPNMB, IL1A, IL1B, IL2RA, IL6, IL24, INHBA, ITGB8, LGMN, LRP1, MPEG1, ME1, MIR155HG, MYOF, PIPI4K2A, PSAP, PTGS2, RNASE1, SEMA6B, SERPINB2, SPINK1, STAB1, ST14, TFPI2, TGF β I, TLR4, TREM1, TREM2, UBASH3B, WNT5A y ZNF467.

El conocimiento de las funciones de estos genes aporta información sobre cómo actúa el Péptido 2+3 en los ensayos realizados y su potencial terapéutico. En este sentido, se disponen en la actualidad de una gran variedad de programas informáticos y bases de datos que revelan información muy importante sobre la funcionalidad de genes, así como el grado de interacción entre ellos. En esta Tesis Doctoral, además de los datos obtenidos por la base de datos del NCBI, se han usado dos programas, DAVID y STRING 9.0, que revelan más información de estos 51 genes. La Tabla 40 y la Figura 33 resumen los resultados de estos análisis.

Muchos de los genes específicamente modulados por el Péptido 2+3 están involucrados en la respuesta inmune a distintos niveles (como muestra la Figura 33, con un gran núcleo central de genes relacionados con esta respuesta), mientras que otros nunca antes se han asociado con este Sistema.

Por un lado, encontramos genes que codifican a receptores de la inmunidad innata y que juegan un papel esencial en el reconocimiento de antígenos frente a los que desarrollan una primera respuesta inmunológica como TLR4, FPR3, TREM1 y TREM2.

En relación al TLR4, se han realizado diversos estudios en los que se analiza la implicación de este receptor en la rinitis alérgica. Sin embargo, los resultados encontrados son dispares (Radman M. *et al.*, 2014). Por un lado, se ha demostrado que en la mucosa nasal de pacientes riníticos, los niveles de expresión de TLR4 (tanto a nivel de RNA como de proteínas) son más elevados que en el caso de sujetos sanos (Fransson M. *et al.*, 2005). Por otro, en un estudio comparativo entre distintos fenotipos clínicos relacionados con la rinitis, se demostró una menor expresión de este receptor en biopsias nasales en los sujetos riníticos (Lauriello M. *et al.*, 2012). En nuestro estudio, hemos comprobado que el Péptido 2+3 provoca una menor expresión de este receptor en PBMC que los demás estímulos. Si bien, parece interesante analizar qué sucede en la mucosa nasal de los pacientes analizados para intentar clarificar la importancia de este receptor en la patología alérgica.

Por su parte, la activación de FPR3 desencadena la quimioatracción y degranulación de neutrófilos para la eliminación de células dañadas, pudiendo estar involucrado en la remodelación del tejido nasal (Prevete N. *et al.*, 2011). Además, este gen fue descrito como potencialmente relevante en la tolerancia/sensibilización en la alergia al polen de olivo en un estudio previo de nuestro laboratorio (Aguerri M. *et al.*, 2013). En el presente estudio, el Péptido 2+3 provoca una disminución de la expresión de FPR3 respecto a las demás condiciones experimentales, lo que podría sugerir que este Péptido provoca una menor activación del S.I. mediante esta vía.

Respecto a los receptores TREM, TREM1 es un receptor que se expresa en la superficie de neutrófilos y monocitos de manera constitutiva, aunque dicha expresión puede aumentar con la presencia de infecciones fúngicas o bacterianas o por un aumento de mediadores inflamatorios como la prostaglandina 2 (como ocurre en la patología asmática), amplificando la respuesta de los receptores TLR2 y 4 (Buckland K.F. *et al.*, 2011). Además de ser un receptor de membrana, TREM1 tiene también una forma soluble. La elevación del sTREM1 en plasma ha sido relacionada con una mayor gravedad de la respuesta asmática (Bucova M. *et al.*, 2012). En nuestro estudio, comprobamos que el Péptido 2+3 produce un aumento de expresión de este receptor en comparación con lo ocurrido con el estímulo Péptido 10+12+13. Por su parte, a TREM2 se le considera un controlador de la respuesta inmune innata en el Sistema Nervioso Central. Se expresa principalmente en las células microgliales y actúa como proteína antiinflamatoria. La baja expresión de este receptor en esas células se ha asociado a la enfermedad de Alzheimer (Sharif O., Knapp S., 2008), al igual que otro de los genes diferencialmente expresado en este estudio, APOE (Li X. *et al.*,

2015). Ambos genes tienden a estar reprimidos bajo la estimulación con Péptido 2+3 respecto a la situación Basal.

Otros genes están implicados en la presentación antigénica y permiten la activación y proliferación de linfocitos T, por ejemplo, el CD86 que actúa como molécula coseñalizadora en la sinapsis inmunológica entre la APC y el linfocito T, promoviendo una respuesta alérgica de fenotipo Th2 (Kuchroo V.K. *et al.*, 1995; Lenschow D.J. *et al.*, 1995). Algunos estudios han evidenciado la sobreexpresión de esta molécula en APC de las vías respiratorias durante la fase efectora de la enfermedad alérgica y que el silenciamiento de esta molécula, mediante siRNA, reduce la sintomatología asmática en un modelo murino experimental (Asai-Tajiri Y. *et al.*, 2014). Trasladando esta información a los resultados obtenidos en este estudio, comprobamos que el Péptido 2+3 reprime la expresión de este gen respecto a lo que sucede para la condición Basal y Olea, por lo que podría disminuir, en parte, la presentación antigénica, bloqueando la respuesta inmune en la alergia al polen de olivo. Es por tanto una posible diana terapéutica definida por el Péptido 2+3 y evidencia la capacidad inmunomoduladora del mismo.

Muchos de los genes diferencialmente expresados median la actividad de las células del S.I., entre los que destacan, por su relevancia funcional, las quimiocinas e interleucinas. En este estudio, el Péptido 2+3 modula la expresión de algunos genes que las codifican: CCL20, CCL22, CXCL1, IL1A, IL1B, IL2RA, IL6, IL-24 e EBI3 (subunidad de la IL-27 y de la IL-35).

La quimiocina CCL20 es una proteína que participa tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, que actúa como atrayente de linfocitos B, células dendríticas inmaduras y células T, para iniciar la respuesta inmune adaptativa (Starner T.D. *et al.*, 2003). El Péptido 2+3 estimula la transcripción de este gen de manera estadísticamente significativa en comparación con lo que ocurre con la estimulación Péptido 10+12+13.

CCL22 es una de las principales quimiocinas involucradas en la respuesta Th2, que inducen la migración de las celulares inmunitarias a los sitios de inflamación. Estudios previos indican que los pacientes alérgicos, presentan niveles elevados de CCL22 en suero y que la respuesta al tratamiento mediante inmunoterapia disminuye esa concentración (Kucharczyk A. *et al.*, 2010). En nuestros resultados, la expresión de este gen está aumentada significativamente en la condición Péptido 2+3 en comparación con lo que sucede a nivel Basal y con el Péptido 10+12+13, pero no respecto a Olea.

CXCL1 es una quimiocina que, entre otras funciones, actúa como quimioatrayente de neutrófilos y juega un papel importante en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. (Jin L. *et al.*, 2014). Al igual que lo que sucede con CCL22, el Péptido 2+3 produce un aumento de su expresión.

En cuanto a la interleucina 1 (alfa y beta, IL1A e IL1B), esta citocina proinflamatoria, está involucrada tanto en fenómenos de autoinmunidad como de alergia. En la actualidad se han realizado ensayos clínicos con medicamentos que inhiben esa expresión, provocando mejoras en la sintomatología (Krause K. *et al.*, 2012). Ante la estimulación con el Péptido 2+3 parece que el Péptido aumenta la expresión de las subunidades IL1A e IL1B, cuando se compara con la situación Basal y con el Péptido 10+12+13, pero no cuando se compara con Olea.

IL2RA es un gen responsable de la codificación de parte del receptor de la IL-2, un elemento esencial en la vía de señalización de esta citocina, fundamental en la respuesta a antígenos por parte de las células T. También es conocido como el cúmulo de diferenciación 25 (CD25), uno de los marcadores de población de las células Treg (Palomares O. *et al.*, 2010). El Péptido 2+3 produce una sobreexpresión de este gen en comparación con el Péptido 10+12+13.

La interleucina 6 es una proteína secretada por las células del S.I. Innato que induce la expansión de células Th2 e inhibe las de perfil regulador (Doganci A. *et al.*, 2005). Sin embargo, en nuestro estudio se observa que el Péptido 2+3 genera una estimulación de la expresión de esta citocina respecto a la estimulación con el Péptido 10+12+13 y a la condición Basal. Estudios más recientes proponen que la IL-6, junto con el TGF- β , podría reconducir la respuesta inflamatoria, aumentando la producción de IL-10 por parte de las células Treg (McGeachy M.J. *et al.*, 2007).

La IL-24 es una proteína con funciones pleiotrópicas, la sintetizan monocitos, linfocitos B y T (Sahoo A., Im S.H., 2012). En este trabajo, se encuentra sobreexpresada en la condición Péptido 2+3 respecto al Péptido 10+12+13.

EBI3 es una proteína cuya asociación con las proteínas p28 o con IL12-p35, da lugar a la formación de IL-27 o IL-35 respectivamente, ambas con funciones inmunosupresoras (Devergne O. *et al.*, 1996; Pflanz S. *et al.*, 2002). La IL-27 actuaría como molécula antiinflamatoria, mientras que la IL-35 está implicada en la supresión activa por parte de las células Treg (Pope R.M. *et al.*, 2013). IL-27 se secreta de manera inducida en APC activadas por la señalización de los TLR (mayoritariamente en células dendríticas y, en menor medida, en macrófagos, aunque también se expresa en células endoteliales). Actúa sobre células NK, macrófagos, neutrófilos, mastocitos y células endoteliales, y

cuenta con una alta capacidad de modular la respuesta inmune Th1/Th2, de manera similar a las funciones del IFN- γ , activando el fenotipo Th1 en detrimento del Th2 (Dokmeci E., *et al.*, 2011).

Por su parte, la implicación funcional de IL-35 es, en la actualidad, objeto de múltiples estudios por su relación con células Treg y su potencial función reguladora en enfermedades en las que el S.I. está involucrado. La expresión de IL-35 es constitutiva en células Treg (CD4+, CD25+, FOXP3+) de ratón. Sin embargo, en humanos su expresión requiere de la activación previa de este tipo celular (Bardel E. *et al.*, 2008). Algunos autores indican que la IL-35 induce la proliferación de células Treg (IL-35 iTreg) con funciones supresoras similares a las iTreg productoras de IL-10 y TGF- β (Collison L.W. *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta todos estos hallazgos, se considera como una importante diana terapéutica en las enfermedades mediadas por el S.I. (Ye S., *et al.*, 2013).

En el caso concreto de la respuesta alérgica y enfermedades similares, se ha comprobado que ratones EBI3^{-/-}, en respuesta a ovoalbúmina, desarrollan una respuesta de sensibilización alérgica mediada por una respuesta Th2 exagerada, con inflamación de las vías respiratorias, con un incremento en la producción de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, y altos niveles de esinofilia, con respecto a lo que sucede en ratones con fenotipo *wild type* (Dokmeci E. *et al.*, 2011).

En humanos, se ha observado una menor expresión tanto de EBI3 como de IL-35 por parte de PBMC de sujetos riníticos (Wan J. *et al.*, 2014), así como una disminución de la concentración de IL-35 en suero en pacientes asmáticos y con enfermedad obstructiva crónica (Chen C. *et al.*, 2014). Además, algunos autores han demostrado que la inmunoterapia sublingual induce una mayor secreción de IL-35 en suero asociado a mejoría clínica en una cohorte de pacientes alérgicos y/o asmáticos (Woodruff P.G. *et al.*, 2007; Schroder W.A. *et al.*, 2011; Ding L.F. *et al.*, 2014).

En nuestro estudio, comprobamos que la expresión de EBI3 estaba significativamente aumentada con el estímulo Péptido 2+3 respecto al Péptido 10+12+13, lo que evidencia, aún más, el carácter inmunomodulador del Péptido 2+3 y su potencial uso en la terapia de esta enfermedad.

Por su parte la PTGS2, enzima involucrada en la biosíntesis de prostaglandinas (mediadores inflamatorios) (Chan I.H. *et al.*, 2007) y SERPINB2, cuya expresión se ha relacionado con el fenotipo asmático (Schroder W.A. *et al.*, 2010), se encuentran sobreexpresados en alguna de las comparaciones que implican al Péptido 2+3.

De los genes con mayor relevancia clínica, destacan los genes asociados con los procesos de tolerancia del S.I. Estos genes tienen una gran relevancia en este estudio ya que, por un lado, ayudan a entender el mecanismo desencadenado por el posible péptido inmunomodulador y, por

otro, podrían actuar como dianas terapéuticas. En este sentido, encontramos genes asociados a la regulación específica del S.I., por su relación con FOXP3 [marcador de células Treg (Rudensky A.Y., 2011); Feuerer M. *et al.*, 2009]], y, por tanto, fuertemente involucrados en la tolerancia. Además del gen EBI3 (ya descrito con anterioridad) y el receptor de IL2 (IL2RA), destacan otros como DAB2 o LGMN. DAB2 es un gen diana del factor de transcripción FOXP3 en células Treg y promueve la respuesta de TGF- β (Jain N. *et al.*, 2009). Este gen se expresa más en la condición Péptido 10+12+13 que en la condición Péptido 2+3, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. En relación con el gen LGMN, este codifica para una endopeptidasa relacionada con FOXP3 (Probst-Kepper M. *et al.*, 2009), cuya expresión se encuentra reprimida con la estimulación del Péptido 2+3.

Por otro lado, algunos de los genes diferencialmente expresados han sido relacionados con una buena respuesta al tratamiento específico de alérgeno, como los genes C1Qc y STAB1. C1Qc codifica a un componente del C1 del Sistema del Complemento. STAB1 es una proteína de membrana involucrada en la angiogénesis y en la migración de linfocitos a tejidos. Ambos, podrían aumentar su expresión en PBMC de sujetos respondedores a la terapia (Zimmer A. *et al.*, 2012). Sin embargo, en nuestro estudio encontramos que el Péptido 2+3 reprime la expresión de C1Qc, en comparación con lo que ocurre basalmente. Similar a lo que ocurre con STAB1, cuya expresión queda reprimida con el Péptido 2+3 en comparación con lo que sucede con el extracto completo.

Otro grupo de genes se relacionan específicamente con la regulación de la expresión génica, como por ejemplo ZNF467 (que regula la transcripción génica) o están relacionados con mecanismos epigenéticos, como DNMT1 y miR155HG. El gen DNMT1 se encuentra reprimido en la condición Péptido 2+3 respecto a la condición Basal. La proteína codificada por este gen está involucrada en los procesos de metilación del DNA. Muchos de los genes que encontramos como diferencialmente expresados en algunas de las condiciones, están específicamente regulados mediante estos procesos de metilación, como en el caso de DAB2 (Zhang Z. *et al.*, 2014) y la IL-24 (entre otros) (Sahoo A., Im S.H., 2012), así como otros genes que no encontramos diferencialmente expresados en este estudio, pero que podrían verse influenciados por la actividad reguladora de DNMT1, por ejemplo, FOXP3 (Lal G., Bromberg J.S., 2009).

En el caso del miR155HG, es un microRNA y por tanto no codifica para proteína aunque sí actuaría sobre algunos procesos de transducción proteica. Además este microRNA se ha asociado con la activación de células Treg (Stahl H.F. *et al.*, 2009; Lu L.F. *et al.*, 2009). MiR155HG se encuentra sobreexpresado en la condición Péptido 2+3 respecto al Péptido 10+12+13.

Otro de los grandes grupos de genes específicamente modulados por el Péptido 2+3 se relacionan con la adhesión celular: ADAM28, CD36, FCN1 (el Péptido 2+3 provoca una disminución de la expresión de los tres genes en alguna de las comparaciones) e ITGB8 (sobreexpresado con la estimulación Péptido 2+3 respecto al Péptido 10+12+13). A este último gen se le ha relacionado con la mediación de TGF- β en el control de la proliferación epitelial de las vías respiratorias humanas (Fjellbirkeland L. *et al.*, 2003). El inhibidor de proteinasas TFPI2 está involucrado en la remodelación de la matriz extracelular y está sobreexpresado en la condición Péptido 2+3 respecto al Basal y a Olea. Por su parte, TGFBI es una integrina cuya expresión es inducida por el TGF- β y media la adhesión celular a través de la interacción célula-colágeno cuya expresión está reprimida por el Péptido 2+3.

Entre los 51 genes diferencialmente expresados, encontramos muchos que se relacionan con el metabolismo celular APOE, FAAH2 (cataliza la hidrólisis de lípidos bioactivos), FUCA1 (involucrada en la degradación de la fucosa presente en glicoproteínas y glicolípidos), GAA (esencial en la degradación de la glucosa en lisosoma), y ME1 (proteína que genera NADPH en la biosíntesis de ácidos grasos). En todos ellos, a excepción de FAAH2, el Péptido 2+3 tiende a disminuir la expresión de los genes.

Otros genes están involucrados en la señalización intracelular: CAMK1, CD84 (molécula activadora de señalización de linfocitos) y GDE1 que están reprimidos por el Péptido 2+3 en al menos una de las comparaciones; y WNT5A cuya expresión se ve aumentada con el Péptido 2+3 en comparación con lo que sucede a nivel Basal.

De algunos de los genes específicamente modulados por el Péptido 2+3 que consideramos más relevantes, quisimos analizar si los cambios producidos a nivel de mRNA se correlacionaban a nivel proteico (proteínas extraídas de los cultivos de PBMC de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento, n=10, recogidas fuera del periodo de polinización). De este modo, analizamos la expresión proteica de tres genes. Dos receptores de la inmunidad innata: FPR3 y TREM1 y un gen muy relacionado con la regulación del S.I.: EBI3. En los estudios de qRT-PCR, FPR3 se encontraba reprimido ante la estimulación con el Péptido 2+3 respecto a las demás condiciones experimentales, mientras que TREM1 se encontraba sobreexpresado en la condición Péptido 2+3 respecto al estímulo Péptido 10+12+13, justo al contrario de lo que sucedía con EBI3. Sin embargo, en el estudio de expresión proteica y aunque se optimizaron las condiciones experimentales aumentando el número de horas de cultivo de las PBMC hasta las 72 horas (Figura 34), no se pudo comprobar cambios estadísticamente significativos en ninguno de los 3 genes analizados, como refleja la Figura 35.

5 EL PÉPTIDO 2+3 INHIBE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA INDUCIDA POR OLEA

Como ya se ha mencionado anteriormente, los ensayos de proliferación se utilizan para identificar epítomos T en los alérgenos y valorar la respuesta específica de alérgeno. Además con estos ensayos también se pueden evaluar la eficacia de nuevas estrategias de inmunoterapia (Haselden B.M. *et al.*, 2001b; Fellrath J.M., *et al.*, 2003; Tarzi M. *et al.*, 2006; Campbell J.D. *et al.*, 2009; Simms E. *et al.*, 2013). Tradicionalmente, en estos experimentos se ha utilizado timidina tritiada y, aunque la especificidad de la técnica es una de las mejores, el riesgo de utilizar partículas radioactivas ha desplazado esta técnica en beneficio de otras que no conllevan tal riesgo (Mandarapu R. *et al.*, 2014). Por ese motivo decidimos utilizar un sistema más sencillo, que mide la proliferación mediante colorimetría.

En este estudio, se pretendía evaluar la capacidad de inducir una respuesta específica de alérgeno (frente al extracto completo de polen de olivo) y la capacidad de modular esa respuesta *in vitro* por parte del Péptido 2+3 y del Péptido 10+12+13.

Como ya se ha mencionado anteriormente, en estudios previos de nuestro grupo, los péptidos 10, 12 y 13 fueron reconocidos por un alto porcentaje de individuos alérgicos al polen de olivo que desarrollaban una respuesta proliferativa T. Por su parte, los péptidos 2 y 3, fueron mayoritariamente reconocidos por los sujetos no alérgicos e indujeron una mayor secreción de IL-10, tanto en alérgicos al polen de olivo como en los que no lo eran, en comparación con los péptidos 10, 12 y 13 (Cárdaba B. *et al.*, 1998; Cárdaba B. *et al.*, 2007). Además, ninguno de los péptidos indujo la secreción de anticuerpos. Por ello, se pensó que la combinación de todos ellos (péptidos 2, 3, 10, 12 y 13) podría ser una buena alternativa terapéutica para enfermedad. Los péptidos 10, 12 y 13 actuarían como inmunógenos, mientras que los péptidos 2 y 3 modularían la respuesta inmune hacia una respuesta tolerogénica.

Los resultados (Figura 36 A) indican que en los sujetos no alérgicos (n=5) no hay diferencias biológicamente relevantes. Sin embargo, los resultados obtenidos en los sujetos alérgicos al polen de olivo que no reciben tratamiento (n=8) (Figura 36 B) hacen pensar que en las situaciones experimentales en las que participa el Péptido 2+3 se produce un descenso de la proliferación de PBMC (condición Péptido 2+3 y condición Péptido 2+3 + Péptido 10+12+13), siendo ambas estadísticamente menores que los I.E. encontrados para el alérgeno completo (Olea) y con el péptido inmunodominante solo: condición Péptido 10+12+13. Todo ello, evidencia aún más el carácter inmunomodulador del Péptido 2+3. Analizando los valores de los I.E. obtenidos, vemos

que no son muy altos y hay en algunas ocasiones que no llegan al valor 1 (siempre menores que el extracto completo), lo que podría sugerir muerte celular, sin embargo, realizamos un estudio de viabilidad, mediante el colorante azul tripán, de cada una de las condiciones experimentales para evidenciar que los estímulos no producen muerte celular, encontrando unos porcentajes de viabilidad que oscilaban entre el 85 y 90%.

En lo concerniente a este tipo de estudios, se ha analizado la implicación de péptidos derivados de algunos alérgenos, como Fel d 1, y su capacidad de modificar la proliferación de células PBMC frente al antígeno. Los resultados existentes hasta el momento son bastantes dispares, ya que algunos autores indican que los péptidos son capaces de modificar la proliferación (Campbell J.D. *et al.*, 20) mientras que otros no lo corroboran (Haselden B.M. *et al.*, 2001b).

Este tipo de estudio también se ha realizado usando péptidos derivados de Ole e 1, en modelos murinos, en los que se ha analizado bien la proliferación de PBMC (Twaroch T.E. *et al.*, 2011) o de células de bazo (Marazuela E.G. *et al.*, 2008a; Marazuela E.G. *et al.*, 2008b). En estos últimos casos, el pretratamiento con los péptidos inmunodominantes (aa109-130) en ratones sensibilizados al polen de olivo, produjeron una inhibición de la proliferación de estos tipos celulares.

En un paso más allá, y para definir el potencial inmunomodulador de los péptidos, decidimos evaluar si estos eran capaces de disminuir la respuesta proliferativa frente al extracto completo del polen de olivo. (Figura 37).

En el caso de los sujetos no alérgicos, no encontramos diferencias estadísticamente relevantes. En los pacientes alérgicos, sí observamos que en las condiciones en las que participaba el Péptido 2+3 se producía un descenso de la respuesta proliferativa (Figura 37 B). Comparamos los valores obtenidos en cada condición con respecto a lo que sucedía ante la estimulación de Olea y vimos una disminución estadísticamente significativa (alrededor del 40%) en las condiciones Péptido 2+3-24h-Olea y Péptido 2+3 + Péptido 10+12+13- 24h-Olea, lo que pone de manifiesto que este Péptido podría producir una inhibición parcial de la respuesta alérgica frente al polen de olivo, antes que esta se produzca. En relación a los estudios de reversión de la respuesta, la Figura 37 B muestra que el Péptido 2+3 revierte, alrededor del 10%, la respuesta específica de antígeno, aunque sin significación estadística.

Todos estos resultados son bastante prometedores. Sin embargo, estos estudios requieren una optimización de las condiciones experimentales, aumentar el tamaño muestral y la caracterización de la respuesta inmune que promueven estos péptidos.

Englobando todo lo expuesto anteriormente, el presente trabajo proporciona información relevante sobre cómo distintos péptidos derivados del alérgeno principal del polen de olivo, Ole e 1, modulan la secreción de citocinas, la expresión génica y la proliferación celular de PBMC en una población de sujetos clasificados en 5 grupos clínicos relacionados con esta alergia. Los principales hallazgos que han sido discutidos en esta Tesis Doctoral, en relación a los sujetos alérgicos al polen de olivo y a los sujetos no alérgicos, quedan resumidos en la Tabla 41. Dichos hallazgos, en su conjunto, evidencian la posible utilidad de los Péptidos para mejorar la terapia de esta polinosis. Además, algunos de los mecanismos inmunomoduladores regulados por estos Péptidos podrían servir como potenciales dianas terapéuticos/as.

En relación a estos Péptidos, cabe destacar que la mayoría de los resultados obtenidos proponen al Péptido 2+3 como una buena herramienta terapéutica, por su capacidad de: inducir la secreción de IL-10 en los sujetos al polen de olivo durante el periodo de polinización, modular vías KEGG específicas en las muestras recogidas fuera de la polinización de los pacientes alérgicos al polen del olivo (normalizando la expresión de las mismas hacia un fenotipo similar a los sujetos no alérgicos), inducir/reprimir la expresión de genes involucrados en la respuesta reguladora del S.I. y la capacidad de inhibir, en casi un 40%, la respuesta alérgica frente al extracto completo de polen de olivo). Respecto al Péptido 10+12+13, estos inducen la proliferación y activación de linfocitos T y, por tanto, son capaces de activar la respuesta inmunológica en los sujetos alérgicos. Este hecho, y su incapacidad de producir una respuesta B (producción de anticuerpos) (Cárdaba B. *et al.*, 1998), hacen que estos epítomos sean una herramienta terapéutica a tener en cuenta en la alergia al polen de olivo, como también lo recogen otros equipos de investigación (Marazuela E.G. *et al.*, 2008a; Marazuela E.G. *et al.*, 2008b).

La importancia de este trabajo radica además, en que todos los Péptidos utilizados en el estudio, derivan de Ole e 1, que además de ser el alérgeno principal en la alergia al polen de olivo, es el marcador de sensibilización primaria a la familia de las oleáceas (Palomares O. *et al.*, 2006), por lo que estos Péptidos podrían ser útiles en los tratamientos de polinosis frente a otras oleáceas.

Tabla 41. Resumen de los hallazgos más relevantes discutidos en este trabajo. Evidencias del potencial terapéutico de los Péptidos utilizados.

A) En las comparaciones entre sujetos alérgicos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento y sujetos no alérgicos.

Parámetro que modifica	Periodo polinización	SUJETOS ALÉRGICOS AL POLEN DE OLIVO SIN TRATAMIENTO Y NO ALÉRGICOS			
		Sin estimulación	Extracto completo de polen de olivo	Condición experimental	
				Péptido 2+3 (Posible epítipo inmunorregulador) Región aa11-33 de Ole e 1	Péptido 10+12+13 (Epítipos inmunodominantes) Regiones aa91-102 y aa109-130 de Ole e 1
Citocinas reguladoras	Durante	No se encontraron diferencias estadísticamente relevantes	Los pacientes alérgicos son los que presentaron mayores niveles de IL-10	Los pacientes alérgicos presentaron los mayores niveles de IL-10	Los pacientes alérgicos presentaron los mayores niveles de IL-10
	Fuera	Los sujetos no alérgicos presentaron los niveles más elevados de TGF- β		Los pacientes alérgicos presentaron los menores niveles de IL-10. Los pacientes alérgicos presentaron los mayores niveles de TGF- β	Los pacientes alérgicos presentaron los menores niveles de IL-10
Expresión génica	Fuera	Diferencias a nivel basal entre los dos grupos, mayor número de activación de vías KEGG en sujetos alérgicos	Es el estímulo que provoca la activación del mayor número de vías KEGG (muchas de ellas relacionadas con el S.I.)	Normaliza el número y tipo de vías KEGG en los sujetos alérgicos	Provoca la activación, en los sujetos alérgicos, de muchas vías relacionadas con el S.I.
Proliferación celular (inhibición de la respuesta)	Fuera		Respuesta proliferativa mayor en los sujetos alérgicos (respuestas específicas de alérgeno)	Inhibición de la respuesta proliferativa en los sujetos alérgicos pero no en los que no lo son	No inhiben la respuesta proliferativa en ninguno de los grupos

B) En los sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento.

SUJETOS ALÉRGICOS AL POLEN DE OLIVO SIN TRATAMIENTO			
Parámetro que modifica	Estímulo		
	Extracto completo de polen de olivo	Péptido 2+3 (Posible epítipo inmunorregulador) Región aa11-33 de Ole e 1	Péptido 10+12+13 (Epítipos inmunodominantes) Regiones aa91-102 y aa109-130 de Ole e 1
Citocinas reguladoras	Aumento de la secreción de IL-10, en las muestras recogidas fuera del periodo de polinización	Produce un aumento de los niveles de IL-10 en las muestras recogidas durante el periodo de polinización	Induce los menores niveles de IL-10
Expresión génica	Induce una activación de la vía "Interacción de receptores citocina-citocina" en las muestras recogidas durante el periodo de polinización	En el conjunto de las comparaciones modifica la expresión de 51 genes, muchos de ellos relacionados con la regulación del S.I. (Validación de los resultados en las muestras extraídas fuera del periodo de polinización)	
Proliferación celular (muestras recogidas fuera de la polinización)	Origina proliferación celular (respuestas específicas de alérgeno)	Su preestimulación inhibe la respuesta específica de alérgeno	Induce proliferación celular
		La combinación de ambos inducen la menor proliferación celular y su preestimulación inhibe, de manera parcial, la respuesta específica del alérgeno	

CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas de esta Tesis Doctoral son:

1. Los 5 grupos analizados mostraron, por lo general, un patrón diferencial de secreción de anticuerpos IgE e IgE específicos, siendo los pacientes alérgicos al polen de olivo (tanto tratados como sin tratar) los que tuvieron los niveles más elevados de IgE específica. Los sujetos asintomáticos presentaron niveles detectables de estos anticuerpos y los mayores niveles de IgE total.
2. En ausencia de estimulación, los resultados de la secreción de citocinas no definieron ningún perfil diferencial. Sin embargo, los análisis de expresión génica fueron capaces de discriminar las 5 condiciones clínicas previamente establecidas.
3. Respecto a la capacidad de los estímulos de modificar la secreción de citocinas y la expresión génica de las PBMC, los resultados más relevantes se obtuvieron en los grupos de sujetos no alérgicos y los sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento. Del conjunto de las comparaciones se concluye que:
 - 3.1. IL-10 y TGF- β son dos citocinas reguladoras implicadas en la respuesta tolerogénica/alérgica al polen de olivo cuyas secreciones están influenciadas por la carga antigénica ambiental.
 - 3.2. El Péptido 2+3 induce un comportamiento tolerogénico en los individuos alérgicos al polen de olivo, en relación al número y tipo de vías KEGG que normaliza, en las muestras recogidas fuera del periodo de polinización.
 - 3.3. Se ha definido un set de 51 genes específicamente modulados por el Péptido 2+3 en los sujetos alérgicos al polen de olivo, muchos de los cuales están implicados en la regulación del S.I. por lo que pueden ser potenciales dianas terapéuticas en esta enfermedad.
4. El Péptido 2+3 es capaz de inhibir la proliferación de PBMC en sujetos alérgicos al polen de olivo, en respuesta a la estimulación con el extracto completo de polen de olivo.

Por todo ello, el Péptido 2+3 se postula como un buen candidato a tener en cuenta para la mejora de la terapia en la alergia al polen de olivo. Además, debido a la homología existente entre Ole e 1 y otros alérgenos principales de la familia de las oleáceas, este Péptido podría utilizarse como terapia en el conjunto de estas polinosis.

BIBLIOGRAFÍA

- Aalberse R.C., Schuurman J. (2002). IgG4 breaking the rules. *Immunology*. 105: 9-19.
- Abramson M.J., Puy R.M., Weiner J.M. (1995). Is allergen immunotherapy effective in asthma? A meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Respir Crit Care Med*. 151(4): 969-974.
- Abramson M.J., Puy R.M., Weiner J.M. (2003). Allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst. Rev.*4, CD001186.
- Agostinis F., Forti S., Di Berardino F. (2010). Grass transcutaneous immunotherapy in children with seasonal rhinoconjunctivitis. *Allergy*. 65: 410-411.
- Aguerri M., Calzada D., Martín E., Florido F., Quiralte J., Delgado J., Miranda A., López-Cacho J.M., Gallardo S., Lahoz C., Cárdbaba B. (2012). FOXP3 and TGF- β : Differential regulatory molecules between sensitization and tolerance to olive pollen. *Eur J of Inflamm*. 10(2): 193-202.
- Aguerri M., Calzada D., Montaner D., Mata M., Florido F., Dopazo J., Lahoz C., Cárdbaba B. (2013). Differential gene-expression analysis defines a molecular pattern related to olive pollen allergy. *J Biol Regul Homeost Agents*. 27(2): 337-350.
- Akdis C.A., Akdis M., Blesken T., Wymann D., Alkan S.S., Muller U., Blaser K. (1996). Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. *J Clin Invest*. 98: 1676-1683.
- Akdis C.A., Blesken T., Akdis M., Wuthrich B., Blaser K. (1998). Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest*. 102: 98-106.
- Akdis C.A. (2006). Allergy and hypersensitivity: mechanisms of allergic disease. *Curr Opin Immunol*. 18: 718-726.
- Akdis C.A. (2010). Therapies for allergic inflammation: refining strategies to induce tolerance. *Nat Med*. 18: 736-749.
- Akdis C.A., Akdis M. (2011). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 127(1): 18-27.
- Akdis M., Verhagen J., Taylor A., Karamloo F., Karagiannidis C., Cramer R., Thunberg S., Deniz G. (2004). Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med*. 199(11): 1567-1575.
- Akdis M. (2006). Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. *Curr Opin Immunol*. 18: 738-744.
- Akdis M., Akdis C.A. (2009). Therapeutic manipulation of immune tolerance in allergic disease. *Nat Rev Drug Discov*. 8: 645-660.
- Akdis M. (2014). New treatments for allergen immunotherapy. *World Allergy Organ J*. 7(1): 23.

- Akkoc T., Akdis M., Akdis C.A. (2011). Update in the mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy Asthma Immunol Res.* 3: 11-20.
- Alansari A., Hajeer A.H., Bayat A., Eyre S., Carthy D., Ollier W.E. (2001). Two novel polymorphisms in the human transforming growth factor beta 2 gene. *Genes Immun.* 2: 295-296.
- Asai-Tajiri Y., Matsumoto K., Fukuyama S., Kan-O.K., Nakano T., Tonai K., Ohno T., Azuma M., Inoue H., Nakanishi Y. (2014). Small interfering RNA against CD86 during allergen challenge blocks experimental allergic asthma. *Respir Res.* 15(1): 132.
- Bahceciler N.N., Arıkan C., Taylor A., Akdis M., Blaser K., Barlan I.B., Akdis C.A. (2005). Impact of sublingual immunotherapy on specific antibody levels in asthmatic children allergic to house dustmites. *Int Arch Allergy Immunol.* 136: 287-294.
- Barber D., Moreno C., Ledesma A., Serrano P., Galán A., Villalba M., Guerra F., Lombardero M., Rodríguez R. (2007). Degree of olive pollen exposure and sensitization patterns. Clinical implications. *J Invest Allergol Clin Immunol.* 17 Suppl 1: 11-16.
- Barber D., de la Torre F., Feo F., Florido F., Guardia P., Moreno C., Quiralte J., Lombardero M., Villalba M., Salcedo G., Rodríguez R. (2008). Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy.* 63(11): 1550-1558.
- Bardel E., Larousserie F., Charlot-Rabiega P., Coulomb-L'Herminé A., Devergne O. (2008). Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol.* 181(10): 6898-6905.
- Barderas R., Purohit A., Papanikolaou I., Rodríguez R., Pauli G., Villalba M. (2005). Cloning, expression, and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fra e 1. *Clin Immunol.* 115: 351-357.
- Barderas R., Purohit A., Rodríguez R., Pauli G., Villalba M. (2006). Isolation of the main allergen Fra e 1 from ash (*Fraxinus excelsior*) pollen: comparison of the natural and recombinant forms. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 96(4): 557-563.
- Barranco D., Rallo L. (1984) Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. Mº de Agricultura-Junta de Andalucía, Madrid: 387.
- Batanero E., Villalba M., Rodríguez R. (1994a). Glycosylation site of the major allergen from olive tree pollen. Allergenic implications of the carbohydrate moiety. *Mol Immunol.* 31: 31-37.
- Batanero E., Villalba M., López-Otín C., Rodríguez R. (1994b). Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from lilac pollen. Sequence analysis of three cDNA encoding protein isoforms. *Eur J Biochem.* 221(1): 187-193.
- Batanero E., Gonzalez De La Peña M.A., Villalba M., Monsalve R.I., Martín-Esteban M., Rodríguez R. (1996). Isolation, cDNA cloning and expression of Lig v 1, the major allergen from privet pollen. *Clin Exp Allergy.* 26(12): 1401-1410.

- Bauer L., Bohle B., Jahn-Schmid B., Wiedermann U., Daser A., Renz H., Kraft D., Ebner C. (1997). Modulation of the allergic immune response in BALB/c mice by subcutaneous injection of high doses of the dominant T cell epitope from the major birch pollen allergen Bet v 1. *Clin Exp Immunol.* 107: 536–541.
- Bedoui S., Kawamura N., Straub R.H., Pabst R., Yamamura T., von Horsten S. (2003). Relevance of neuropeptide Y for the neuroimmune crosstalk. *J Neuroimmunol.* 134(1-2): 1–11.
- Benjamin D.C., Berzofsky J.A., East I.J., Gurd F.R., Hannum C., Leach S.J., Margoliash E., Michael J.G., Miller A., Prager E.M., Reichlin M., Sercarz E.E., Smith-Gill S.J., Todd P.E., Wilson A.C. (1984). The antigenic structure of proteins: a reappraisal. *Annu Rev Immunol.* 2: 67-101.
- Benjamini Y., Hochberg Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *R Stat Soc. Series B;* 57(1): 289–300.
- Benson M., Olsson M., Rudemo M., Wennergren G., Cardelli L.O. (2004). Pros and cons of microarray technology in allergy research. *Clin Exp Allergy.* 34(7): 1001-1006.
- Benson M., Mobini R., Barrenäs F., Halldén C., Naluai A.T., Säll T., Cardelli L.O. (2009). A haplotype in the inducible T-cell tyrosine kinase is a risk factor for seasonal allergic rhinitis. *Allergy.* 64(9): 1286-1291.
- Bernstein D.I., Wanner M., Borish L., Liss G.M. (2004). Twelve-year survey of fatal reactions to allergen injections and skin testing: 1990-2001. *J Allergy Clin Immunol.* 113: 1129-1136.
- Bird A.P. (1980). DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucl Acids Res.* 8: 1499–1504.
- Blanca M., Boulton P., Brostoff J., Gonzalez-Reguera I. (1983). Studies of the allergens of *Olea europea* pollen. *Clin Allergy.* 13(5): 473-478.
- Blanco C., Crespo J.F., Cabans R., Vega A., López C., Martínez F. (1992). *Olea europea* pollen allergy. *Allergy.* 47(suppl.): 77.
- Bolstad B.M., Irizarry R. A., Astrand M., Speed, T.P. (2003). A Comparison of Normalization Methods for High Density Oligonucleotide Array Data Based on Bias and Variance. *Bioinformatics.* 19(2): 185-193.
- Bousquet J., Cour P., Guerin B., Michel F.B. (1984). Allergy in the Mediterranean area. I. Pollen counts and pollinosis of Montpellier. *Clin Allergy.* 14(3): 249-258.
- Bousquet J., Guérin B., Hewitt B., Lim S., Michel F.B. (1985). Allergy in the Mediterranean area. III: Cross reactivity among Oleaceae pollens. *Clin Allergy.* 15(5): 439-448.
- Bousquet J., Braquemond P., Feinberg J., Guerin B., Maasch H., Michel F.B. (1986). Specific IgE response before and after rush immunotherapy with a standardized allergen or allergoid in grass pollen allergy. *Ann Allergy.* 56: 456-459.
- Bousquet J., Lockey R., Malling H.J., Alvarez-Cuesta E., Canonica G.W., Chapman M.D., Creticos P.J., Dayer J.M., Durham S.R., Demoly P., Goldstein R.J., Ishikawa T., Ito K., Kraft D.,

- Lambert P.H., Løwenstein H., Müller U., Norman P.S., Reisman R.E., Valenta R., Valovirta E., Yssel H. (1998). Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 81(5 Pt 1): 401-405.
- Bousquet J., Demoly P. (2006). Specific immunotherapy-an optimist future Editorial. *Allergy.* 61: 1155-1158.
 - Boyce J.A. (2008). Eicosanoids in asthma, allergic inflammation, and host defense. *Curr Mol Med.* 8(5): 335-349.
 - Branton M.H., Kopp J.B. (1999). TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect.* 1: 1349-1365.
 - Braza F., Chesne J., Castagnet S., Magnan A. (2014). Brouard S. Regulatory functions of B cells in allergic diseases. *Allergy.* 69(11): 1454-1463.
 - Briner T.J., Kuo M.C., Keating K.M., Rogers B.L., Greenstein J.L. (1993). Peripheral T-cell tolerance induced in naive and prime by subcutaneous injection of peptides from the major cat allergen Feld d 1. *Proc Nat Acad Sci USA.* 90: 7608-7612.
 - Brito F.F., Gimeno P.M., Carnés J., Martín R., Fernández-Caldas E., Lara P., López-Fidalgo J., Guerra F. (2011). Olea europaea pollen counts and aeroallergen levels predict clinical symptoms in patients allergic to olive pollen. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 106(2): 146-152.
 - Broide D., Schwarze J., Tighe H., Gifford T., Nguyen M.D., Malek S., Van Uden J., Martin-Orozco E., Gelfand E.W., Raz E. (1998). Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol.* 161: 7054-7062.
 - Bruhn S., Katzenellenbogen M., Gustafsson M., Krönke A., Sönnichsen B., Zhang H., Benson M. (2012). Combining gene expression microarray-and cluster analysis with sequence-based predictions to identify regulators of IL-13 in allergy. *Cytokine.* 60(3): 736-740.
 - Brutsche M.H., Joos L., Carle Brutsche I.E., Bissinger R., Tamm M., Custovic A., Woodcock, A. (2002). Array-based diagnostic gene-expression score for atopy and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 109(2): 271-273.
 - Buckland K.F., Ramaprakash H., Murray L.A., Carpenter K.J., Choi E.S., Kunkel S.L., Lukacs N.W., Xing Z., Aoki N., Hartl D., Hogaboam C.M. (2011). Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) modulates immune responses to *Aspergillus fumigatus* during fungal asthma in mice. *Immunol Invest.* 40(7-8): 692-722.
 - Bucova M., Suchankova M., Dzurilla M., Vrlik M., Novosadova H., Tedlova E., Urban S., Hornakova E., Seligova M., Durmanova V., Penz P., Javor J., Paulovicova E. (2012). Inflammatory marker sTREM-1 reflects the clinical stage and respiratory tract obstruction in allergic asthmabronchiale patients and correlates with number of neutrophils. *Mediators Inflamm.* 628754.
 - Bungy G.A., Rodda S., Roitt I., Brostoff J. (1994). Mapping of T cell epitopes of the major fraction of rye grass using peripheral blood mononuclear cells from atopics and non-

- atopics. II. Isoallergen clone 5A of *Lolium perenne* group I (Lol p I). *Eur J Immunol.* 24(9): 2098-2103.
- Burks A.W., Calderon M.A., Casale T., Cox L., Demoly P., Jutel M., Nelson H., Akdis C.A. (2013). Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report. *J Allergy Clin Immunol.* 131(5): 1288-1296.e3.
 - Calderón M.A., Alves B., Jacobson M., Hurwitz B., Sheikh A., Durham S. (2007). Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst. Rev.*1, CD001936.
 - Calderón M.A., Simons F.E., Malling H.J., Lockey R.F., Moingeon P., Demoly P. (2012). Sublingual allergen immunotherapy: mode of action and its relationship with the safety profile. *Allergy.* 67(3): 302-311.
 - Calderón M., Cardona V., Demoly P. EAACI. 100 Years of Immunotherapy Experts Panel. (2012). One hundred years of allergen immunotherapy European Academy of Allergy and Clinical Immunology celebration: review of unanswered questions. *Allergy.* 67(4): 462-476.
 - Calzada D., Aguerri M., Baos S., Lahoz C., Cárdbaba B. (2015). Epigenetic regulation analyses of FOXP3 in olive pollen allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol.* En prensa.
 - Campbell J.D., Buckland K.F., McMillan S.J., Kearley J., Oldfield W.L., Stern L.J., Grönlund H., van Hage M., Reynolds C.J., Boyton R.J., Cobbold S.P., Kay A.B., Altmann D.M., Lloyd C.M., Larché M. (2009). Peptide immunotherapy in allergic asthma generates IL-10-dependent immunological tolerance associated with linked epitope suppression. *J Exp Med.* 206(7):1535- 1547.
 - Canonica G.W., Cox L., Pawankar R., Baena-Cagnani C.E., Blaiss M., Bonini S., Bousquet J., Calderón M., Compalati E., Durham S.R., van Wijk R.G., Larenas-Linnemann D., Nelson H., Passalacqua G., Pfaar O., Rosário N. Ryan D., Rosenwasser L., Schmid-Grendelmeier P., Senna G., Valovirta E., Van Bever H., Vichyanond P., Wahn U., Yusuf O. (2014). Sublingual immunotherapy: World Allergy Organization position paper 2013 update. *World Allergy Organ J.* 7(1): 6.
 - Cantillo J.F., Puerta L. (2010). Nuevos esquemas de inmunoterapia específicos con alérgenos. *Biomédica.* 30: 440-453.
 - Carballido J.M., Carballido-Perrig N., Kägi M.K., Meloen R.H., Wüthrich B., Heusser C.H., Blaser K. (1993). T cell epitope specificity in human allergic and non-allergic subjects to bee venom phospholipase A2. *J Immunol.* 150(8 Pt 1): 3582-3591.
 - Cárdbaba B., Vilches C., Martín E., de Andrés B., del Pozo V., Hernández D., Gallardo S., Fernández J.C., Villalba M., Rodríguez R., Palomino P., Lahoz C. (1993). DR7 and DQ2 are positively associated with immunoglobulin-E response to the main antigen of olive pollen (Ole e I) in allergic patients. *Hum Immunol.* 38(4): 293-299.
 - Cárdbaba B., Del Pozo V., Jurado A., Gallardo S., Cortegano I., Arrieta I., Del Amo A., Tramón P., Florido F., Sastre J., Palomino P., Lahoz C. (1998). Olive pollen allergy: searching for immunodominant T-cell epitopes on the Ole e 1 molecule. *Clin Exp Allergy.* 28(4): 413-422.

- Cárdbaba B., Llanes E., Chacártegui M., Sastre B., López E., Mollá R., del Pozo V., Florido F., Quiralte J., Palomino P., Lahoz C. (2007). Modulation of allergic response by gene-environment interaction: olive pollen allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 17 Suppl 1: 31-35.
- Cárdbaba B., Aguerri M., Calzada D., Lahoz C. (2012). New Challenges for Old Diseases: The Impact of -Omics Technologies in the Understanding of Allergic Diseases. Allergic Diseases - Highlights in the Clinic, Mechanisms and Treatment, ISBN 978-953-51-0227-4.
- Carlson M., Håkansson L., Kämpe M., Stålenheim G., Peterson C., Venge P. (1992). Degranulation of eosinophils from pollen-atopic patients with asthma is increased during pollen season. *J Allergy Clin Immunol*. 89(1 Pt 1): 131-139.
- Carreira J., Polo F. (1995). The allergens of *Olea europea* and *Parietaria* spp. and their relevance in the Mediterranean area. *ACI News*. 7: 79.
- Casale T.B., Busse W.W., Kline J.N., Ballas Z.K., Moss M.H., Townley R.G., Mokhtarani M., Seyfert-Margolis V., Asare A., Bateman K., Deniz Y., Immune Tolerance Network Group. (2006). Omalizumab pretreatment decreases acute reactions after rush immunotherapy for ragweed-induced seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 117(1): 134-140.
- Casanovas M., Guerra F., Moreno C., Miguel R., Marañón F., Daza J.C. (1994). Double-blind, placebo-controlled clinical trial of preseasonal treatment with allergenic extracts of *Olea europaea* pollen administered sublingually. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 4(6): 305-314.
- Cavkaytar O., Akdis C.A., Akdis M. (2014). Modulation of immune responses by immunotherapy in allergic diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 17: 30-37.
- Chaib H., Cockrell E.K., Rubin M.A., Macoska J.A. (2001). Profiling and verification of gene expression patterns in normal and malignant human prostate tissues by cDNA microarray analysis. *Neoplasia*. 3(1): 43-52.
- Chamberland A., Madore A.M., Tremblay K., Laviolette M., Laprise C. (2009). A comparison of two sets of microarray experiments to define allergic asthma expression pattern. *Exp Lung Res*. 35(5): 399-410.
- Chan I.H., Tang N.L., Leung T.F., Ma S.L., Zhang Y.P., Wong G.W., Wong C.K., Lam C.W. (2007). Association of prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene polymorphisms with asthma and atopy in Chinese children. *Allergy*. 62(7): 802-809.
- Chen C., Deng Y., Chen H., Wu X., Cheng S., Xu Y., Xiong W., Xie J. (2014). Decreased concentration of IL-35 in plasma of patients with asthma and COPD. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 32(3): 211-217.
- Chen R., Lowe L., Wilson J.D., Crowther E., Tzeggai K., Bishop J.E., Varro R. (1999). Simultaneous quantification of six human cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. *Clin Chem*. 9: 1693-1694.

- Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K.J., Li L., Marinos N., McGrady G., Wahl S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 198: 1875–1886.
- Chen Z., Lin F., Gao Y., Li Z., Zhang J., Xing Y., Deng Z., Yao Z., Tsun A., Li B. (2011). FOXP3 and RORyt: transcriptional regulation of Treg and Th17. *Int Immunopharmacol.* 11(5): 536-542.
- Collison L.W., Chaturvedi V., Henderson A.L., Giacomini P.R., Guy C., Bankoti J., Finkelstein D., Forbes K., Workman C.J., Brown S.A. (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol* 11: 1093–1101.
- Compalati E., Penagos M., Tarantini F., Passalacqua G., Canonica G.W. (2009). Specific immunotherapy for respiratory allergy: state of the art according to current meta-analyses. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 102: 22-28.
- Cooke R.A., Barnard J.H., Hebdal S., Stull A. (1935). Serological immunity with coexisting sensitization in a type of human allergy (hay fever). *J Exp Med.* 62: 733-750.
- Cox L.S. (2009). How safe are the biologicals in treating asthma and rhinitis? *Allergy Asthma Clin Immunol.* 5(1):4.
- Coyle A.J., Le Gros G., Bertrand C., Tsuyuki S., Heusser C.H., Kopf M. (1995). Interleukin-4 is required for the induction of lung Th2 mucosal immunity. *Amer J Resp Cell Mol Bio.* 13(1): 54–59.
- Creticos P.S., Adkinson N.F. Jr, Kagey-Sobotka A., Proud D., Meier H.L., Naclerio R.M., Lichtenstein L.M., Norman P.S. (1985). Nasal challenge with ragweed pollen in hay fever patients. Effect of immunotherapy. *J Clin Invest.* 76: 2247-2253.
- Creticos P.S., Schroeder J.T., Hamilton R.G., Balcer-Whaley S.L., Khattignavong A.P., Lindblad R., Li H., Coffman R., Seyfert V., Eiden J.J., Broide D.; Immune Tolerance Network Group. (2006). Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N Engl J Med.* 355: 1445–1455.
- Creticos P.S. (2014). Advances in synthetic peptide immuno-regulatory epitopes. *World Allergy Organ J.* 7(1): 30.
- D'Amato G., Liccardi G. (1994). Pollen-related allergy in the European Mediterranean area. *Clin Exp Allergy.* 24(3): 210-219.
- Davies R.R., Smith I.P. (1973). Forecasting the start and severity of the hay fever season. *Clin Allergy.* 3: 263-267.
- De Dios Alché J., Castro A.J., Olmedilla A., Fernández M.C., Rodríguez R., Villalba M., Rodríguez-García M.I. (1999). The major olive pollen allergen (Ole e 1) shows both gametophytic and sporophytic expression during anther development, and its synthesis and storage takes place in the RER. *J Cell Sci.* 112 (Pt 15): 2501-2509.
- De Dios Alché J., M'rani-Alaoui M., Castro A.J., Rodríguez-García M.I. (2004). Ole e 1, the major allergen from olive (*Olea europaea* L.) pollen, increases its expression and is released to the culture medium during in vitro germination. *Plant Cell Physiol.* 45(9): 1149-1157.

- De Groot A.S., Moise L., McMurry J.A., Wambre E., Van Overtvelt L., Moingeon, P., Scott D.W., Martin W. (2008). Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide "Tregitopes". *Blood*. 112: 3303-3311.
- De Vries J.E., Lamb J.R. (1994). Immunotherapy with allergen-derived epitopes. *ACI News*. 6: 49-53.
- De Waal Malefyt R., Abrams J., Bennett B., Figdor C.G., De Vries J.E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 174: 1209-1220.
- Dębińska A., Boznański A. (2014). The role of Toll-like receptors in the pathogenesis of allergic diseases - where is the truth? *Postepy Hig Med Dosw*. 68: 230-237 (Solo resumen).
- Deniz G., van de Veen W., Akdis M. (2013). Natural killer cells in patients with allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 132(3): 527-535.
- Devergne O., Hummel M., Koeppen H., Le Beau M.M., Nathanson E. C., Kieff E., Birkenbach M. (1996). A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. *J Virol*. 70: 1143-1153.
- Ding L.F., Chen Q., Li L., Liu J.M., Zhang G.P., Zhu X.H., Wu A.M., Ke J.W., Dai Y.L., Wu C.X. (2014). Effects of sublingual immunotherapy on serum IL-17 and IL-35 levels in children with allergic rhinitis or asthma. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 16(12): 1206-1210. (Solo resumen).
- Doganci A., Sauer K., Karwot R., Finotto S. (2005). Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice. *Clin Rev Allergy Immunol*. 28(3): 257-270.
- Dokmeci E., Xu L., Robinson E., Golubets K., Bottomly K., Herrick C.A. (2011). EB13 deficiency leads to diminished T helper type 1 and increased T helper type 2 mediated airway inflammation. *Immunology*. 132(4): 559-566.
- Dorsam G.P., Hoselton S.A., Sandy A.R., Samarasinghe A.E., VomhofDekrey E.E., Dorsam S.T., Schuh J.M. (2010). Gene expression profiling and network analysis of peripheral blood monocytes in a chronic model of allergic asthma. *Microbiol Immunol*. 54(9): 559-563.
- Dreborg S., Frew A. (1993). EAACI Subcommittee on Skin Tests. Position paper Allergen standardization and skin tests. *Allergy*. 48(14 Suppl.): 49.
- Durham S.R., Walker S.M., Varga E.M., Jacobson M.R., O'Brien F., Noble W., Till S.J., Hamid Q.A., Nouri-Aria K.T. (1999). Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med*. 341(7): 468-47.
- Durham S.R., Nelson H.S., Nolte H., Bernstein D.I., Creticos P.S., Li Z., Andersen J.S. (2014). Magnitude of efficacy measurements in grass allergy immunotherapy trials is highly dependent on pollen exposure. *Allergy*. 69(5): 617-623.

- EAACI. (1989). Skin tests used in type I allergy testing Position paper. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy*. 44(S) 10: 1-59.
- Ebner C., Szépfalusi Z., Ferreira F., Jilek A., Valenta R., Parronchi P., Maggi E., Romagnani S., Scheiner O., Kraft D. (1993). Identification of multiple T cell epitopes on Bet v I, the major birch pollen allergen, using specific T cell clones and overlapping peptides. *J Immunol*. 150(3): 1047-1054.
- Ebner C., Siemann U., Najafian N., Scheiner O., Kraft D. (1995). Characterization of allergen (Bet v 1)-specific T cell lines and clones from non-allergic individuals. *Int Arch Allergy Immunol*. 107(1-3): 183-185.
- Elbers C.C., van Eijk K.R., Franke L., Mulder F. (2009). Using Genome-Wide Pathway Analysis to Unravel the Etiology of Complex Diseases. *Genet Epidemiol*. 33(5): 419-431.
- Elyaman W., Khoury S.J., Scott D.W., De Groot, A.S. (2011). Potential applications of Tregitopes as Immunomodulating agents in Multiple Sclerosis. *Neurol Res Int*. e-pub ahead of print 15 September; doi:10.1155/2011/256460.
- Esteve C., Montealegre C., Marina M.L., García M.C. (2012). Analysis of olive allergenes. *Talanta*. 92: 1-14.
- Ewbank P.A., Murray J., Sanders K., Curran-Everett D., Dreskin S., Nelson H.S. (2003). A double-blind, placebo- controlled immunotherapy dose-response study with standardized cat extract. *J Allergy Clin Immunol*. 111: 155-161.
- Faraggi D., Reiser B., Schisterman E.F. (2003). ROC curve analysis for biomarkers based on pooled assessments. *Stat Med*. 22(15): 2515-2527.
- Fedorov A.A., Ball T., Mahoney N.M., Valenta R., Almo S.C. (1997). The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin. *Structure*. 5(1): 33-45.
- Fehlner P.F., Kochoumian L., King T.P. (1991). Murine IgE and IgG responses to melittin and its analogs. *J Immunol*. 146(8): 2664-2670.
- Fellrath J.M., Kettner A., Dufour N., Frigerio C., Schneeberger D., Leimgruber A., Corradin G., Spertini F. (2003). Allergen-specific T-cell tolerance induction with allergen-derived long synthetic peptides: results of a phase I trial. *J Allergy Clin Immunol*. 111(4): 854-861.
- Feuerer M., Jonathan A.H, Mathis D., Benoist C. (2009). Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol*. 10(7): 689-695.
- Fiandor A., Olalde S. (2008). Inmunoterapia específica con alérgenos. *Inf Ter Sist Nac Salud*. 32: 39-44.
- Fjellbirkeland L., Cambier S., Broaddus V.C., Hill A., Brunetta P., Dolganov G., Jablons D., Nishimura S.L. (2003). Integrin alpha beta8-mediated activation of transforming growth factor-beta inhibits human airway epithelial proliferation in intact bronchial tissue. *Am J Pathol*. 163(2): 533-542.

- Flicker S., Valenta R. (2003). Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 132: 13-24.
- Florido J.F., Delgado P.G., de San Pedro B.S., Quiralte J., de Saavedra, J.M., Peralta V., Valenzuela L.R. (1999). High levels of *Olea europea* pollen and relation with clinical findings. *Int Arch Allergy Immunol.* 119(2): 133-137.
- Florido F.J., Quiralte J. (2000). Connotaciones etiopatogénicas del asma bronquial inducido por polen de olivo. En: Prieto L, ed. *Facetas Inéditas en Asma Bronquial. Madrid Editorial Médicos SA:* 289-304.
- Focke-Tejkl M., Weber M., Niespodziana K., Neubauer A., Huber H., Henning R., Stegfellner G., Maderegger B., Hauer M., Stolz F., Niederberger V., Marth K., Eckl-Dorna J., Weiss R., Thalhamer J., Blatt K., Valent P., Valenta R. (2014). Development and characterization of a recombinant, hypoallergenic, peptide-based vaccine for grass pollen allergy. *J Allergy Clin Immunol.* pii: S0091-6749(14)01322-0.
- Francis J.N., Till S.J., Durham S.R. (2003). Induction of IL-10+CD4+CD25+T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 111: 1255-1261.
- Fransson M., Adner M., Erjefält J., Jansson L., Uddman R., Cardell O. (2005). Up-regulation of Toll-like receptors 2, 3 and 4 in allergic rhinitis. *Respir Res.* 6: 100.
- Freeman J. (1914). Vaccination against hay fever, report of results during the last years. *Lancet.* 1: 1178-1180.
- Freeman J. (1930). Rush inoculation. *Lancet.* 1: 744.
- Frew A.J., Powell R.J., Corrigan C.J., Durham S.R. 2006. Efficacy and safety of specific immunotherapy with SQ allergen extract in treatment-resistant seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol.* 117: 319-325.
- Gabriëlsson S., Söderlund A., Paulie S., van der Pouw Kraan T.C., TroyeBlomberg M., Rak S. (2001). Specific immunotherapy prevents increased levels of allergen-specific IL-4- and IL-13-producing cells during pollen season. *Allergy.* 56(4): 293-300.
- Gajhede M., Osmark P., Poulsen F.M., Ipsen H., Larsen J.N., Joost van Neerven R.J., Schou C., Løwenstein H., Spangfort M.D. (1996). X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nat Struct Biol.* 3(12): 1040-1045.
- Gaspar A., Milhazes N., Santana L., Uriarte E., Borges F., Matos M.J. (2015). Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: Looking for a Therapeutic Solution Inspired on Benzopyran Chemistry. *Curr Top Med Chem.* 2015 Feb 6. [Epub ahead of print].
- Gidaro G.B., Marcucci F., Sensi L., Incorvaia C., Frati F., Ciprandi G. (2005). The safety of sublingual-swallow immunotherapy: an analysis of published studies. *Clin Exp Allergy.* 35: 565-571.

- Gioulekas D., Chtzigeorgiou G., Likogiannis S., Papakosta D., Mpalafoutis C., Spieksma F. (1991). *Olea europaea* 3-year pollen record in the area of Thessaliniki, Greece and its sensitizing significance. *Aerobiología*. 7: 57.
- Gleich G.J., Zimmermann E.M., Henderson L.L., Yunginger J.W. (1982). Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six-year prospective study. *J Allergy Clin Immunol*. 70: 261-271.
- Gokmen N.M., Ersoy R., Gulbahar O., Ardeniz O., Sin A., Unsel M., Kokuludag A. (2012). Desensitization effect of preseasonal seven-injection allergoid immunotherapy with olive pollen on basophil activation: the efficacy of olive pollen-specific preseasonal allergoid immunotherapy on basophils. *Int Arch Allergy Immunol*. 159(1): 75-82.
- González E.M., Villalba M., Lombardero M., Aalbers M., van Ree R., Rodríguez R. (2002). Influence of the 3D-conformation, glycan component and microheterogeneity on the epitope structure of Ole e 1, the major olive allergen. Use of recombinant isoforms and specific monoclonal antibodies as immunological tools. *Mol Immunol*. 39: 93-101.
- González E.M., Villalba M., Quiralte J., Batanero E., Roncal F., Albar J.P., Rodríguez R. (2006). Analysis of IgE and IgG B-cell immunodominant regions of Ole e 1, the main allergen from olive pollen. *Mol Immunol*. 43: 570-578.
- González P., Florido F., Sáenz de San Pedro B., de la Torre F., Rico P., Martín S. (2002). Immunotherapy with an extract of *Olea europaea* quantified in mass units. Evaluation of the safety and efficacy after one year of treatment. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 12(4): 263-271.
- Gorelik L., Fields P.E., Flavell R.A. (2000). Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol*. 165: 4773-4777.
- Gorelik L., Constant S., Flavell R.A. (2002). Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med*. 195: 1499-1505.
- Grgacic E.V., Anderson D.A. (2006). Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods*. 40: 60-65.
- Gri G., Piconese S., Frossi B., Manfroi V., Merluzzi S., Tripodo C., Viola A., Odom S., Rivera J., Colombo M.P., Pucillo C.E. (2008). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity*. 29: 771-781.
- Grimbaldston M.A., Nakae S., Kalesnikoff J., Tsai M., Galli S.J. (2007). Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat Immunol*. 8: 1095-1104.
- Groneberg D.A., Folkerts G., Peisera C., Chung K. F., Fischer A. (2004). Neuropeptide Y (NPY). *Pulm Pharmacol Ther*. 17(4): 173-180.
- Guerra F., Carracedo J., Solana-Lara R., Sanchez-Guijo P & Ramirez R. (2001). Th2 lymphocytes from atopic patients treated with immunotherapy undergo rapid apoptosis after culture with specific allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 107:647-53.

- Guibas G.V., Makris M., Papadopoulos N.G. (2013). Key regulators of sensitization and tolerance: GM-CSF, IL-10, TGF- β and the Notch signaling pathway in adjuvant-free experimental models of respiratory allergy. *Int Rev Immunol.* 32(3): 307-323.
- Guida G., Boita M., Scirelli T., Bommarito L., Heffler E., Badiu I., Bellone G., Mietta S., Mistrello G., Rolla G. (2012). Innate and lymphocytic response of birch-allergic patients before and after sublingual immunotherapy. *Allergy Asthma Proc.* 33(5): 411-415.
- Gupta R.A., Brockman J.A., Sarraf P., Willson T.M., DuBois R.N. (2001). Target genes of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colorectal cancer cells. *J Biol Chem.* 276(32): 29681-29687.
- Guseh J.S., Bores S.A., Stanger B.Z., Zhou Q., Anderson W.J., Melton D.A, Rajagopal J. (2009). Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development. *Development.* 136: 1751-1759.
- Hamid Q., Azzawi M., Ying S., Moqbel R., Wardlaw A.J., Corrigan C.J., Bradley B., Durham S.R., Collins J.V., Jeffery P.K., *et al.* (1991). Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. *J Clin Invest.* 87(5): 1541-1546.
- Hansel N.N., Cheadle C., Diette G.B., Wright J., Thompson K.M., Barnes K.C., Georas S.N. (2008). Analysis of CD4+ T-cell gene expression in allergic subjects using two different microarray platforms. *Allergy.* 63(3): 366-369.
- Hartemink A.J., Gifford D.K., Jaakkola T.S., Young R.A. (2001). Using graphical models and genomic expression data to statistically validate models of genetic regulatory networks. *Pac Sym Biocomput.* 422-433.
- Hasegawa K., Tamari M., Shao C., Shimizu M., Takahashi N., Mao X.Q., Yamasaki A., Kamada F., Doi S., Fujiwara H., Miyatake A., Fujita K., Tamura G., Matsubara Y., Shirakawa T., Suzuki Y. (2004). Variations in the C3, C3a receptor, and C5 genes affect susceptibility to bronchial asthma. *Hum Genet.* 115(4): 295-301.
- Haselden B.M., Larché M., Meng Q., Shirley K., Dworski R., Kaplan A.P., Bates C., Robinson D.S., Ying S., Kay A.B. (2001a). Late asthmatic reactions provoked by intradermal injection of Tcell peptide epitopes are not associated with bronchial mucosal infiltration of eosinophils or T(H)2-type cells or with elevated concentrations of histamine or eicosanoids in bronchoalveolar fluid. *J Allergy Clin Immunol.* 108: 394-401.
- Haselden B.M., Syrigou E., Jones M., Huston D., Ichikawa K., Chapman M.D., Kay A.B., Larché M. (2001b). Proliferation and release of IL-5 and IFN-gamma by peripheral blood mononuclear cells from cat-allergic asthmatics and rhinitics, non-cat-allergic asthmatics, and normal controls to peptides derived from Fel d 1 chain 1. *J Allergy Clin Immunol.* 108: 394-401.
- Heath V.L., Kurata H., Lee H.J., Arai N., O'Garra A. (2002). Checkpoints in the regulation of T helper 1 responses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 266: 23-39.
- Higgins J.A., Thorpe C.J., Hayball J.D., O'Hehir R.E., Lamb J.R. (1994). Overlapping T-cell epitopes in the group I allergen of *Dermatophagoides* species restricted by HLA-DP and HLA-DR class II molecules. *J Allergy Clin Immunol.* 93(5): 891-899.

- Hirayama S., Ishii G., Nagai K., Ono S., Kojima M., Yamauchi C., Aokage K., Hishida T., Yoshida J., Suzuki K., Ochiai A. (2012). Prognostic impact of CD204-positive macrophages in lung squamous cell carcinoma: possible contribution of Cd204-positive macrophages to the tumor-promoting microenvironment. *J Thorac Oncol.* 7(12): 1790-1797.
- Holgate S.T., Lackie P.M., Davies D.E., Roche W.R., Walls A.F. (1999). The bronchial epithelium as a key regulator of airway inflammation and remodelling in asthma. *Clin Exp Allergy.* 29 Suppl 2: 90-95.
- Holguin F. (2013). Oxidative stress in airway diseases. *Ann Am Thorac Soc.* 10 Suppl: S150-157.
- Hopp R.J., Bewtra A.K., Watt G.D. (1984). Genetic analysis of allergic disease in twins. *J Allergy Clin Immunol.* 73(2): 265-270.
- Horner A.A., Nguyen M.D., Ronaghy A., Cinman N., Verbeek S., Raz E. (2000). DNA-based vaccination reduces the risk of lethal anaphylactic hypersensitivity in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 106: 349-356.
- Horner A.A., Takabaysahi K., Zubeldia J.M., Raz E. (2002). Immunostimulatory DNA-based therapeutics for experimental and clinical allergy. *Allergy.* 57 Suppl 72: 24-29.
- Hoyne G.F., O'Hehir R.E., Wraith D.C., Thomas W.R., Lamb J.R. (1993). Inhibition of T cell and antibody responses to house dust mite allergen by inhalation of the dominant T cell epitope in naive and sensitized mice. *J Exp Med.* 178: 1783-1788.
- Hsu C.H., Chua K.Y., Tao M.H., Lai Y.L., Wu H.D., Huang S.K., Hsieh K.H. (1996). Immunoprophylaxis of allergen induced immunoglobulin E synthesis and airway hyperresponsiveness in vivo by genetic immunization. *Nat Med.* 2: 540-544.
- Huecas S., Villalba M., González E., Martínez A., Rodríguez R. (1999). Production and detailed characterization of biologically active olive pollen allergen Ole e 1 secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Eur J Biochem.* 261: 539-546.
- Humbert M., Corrigan C.J., Kimmitt P., Till S.J., Kay A.B., Durham S.R. (1997). Relationship between IL-4 and IL-5 mRNA expression and disease severity in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 156: 704-708.
- Incorvaia C., Frati F. (2011). One century of allergen specific immunotherapy for respiratory allergy. *Immunotherapy.* 3(5): 629-635.
- Irizarry R.A., Hobbs B., Collin F., Beazer Barclay Y.D., Antonellis K.J., Scherf U., Speed T.P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* 4(2): 249-264.
- Izuhara K., Saito H. (2006). Microarray-based identification of novel biomarkers in asthma. *Allergol Int.* 55(4): 361-367.
- Jahn-Schmid B., Wiedermann U., Bohle B., Repa A., Kraft D., Ebner C. (1999). Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs modulate the allergic TH2 response of

- BALB/c mice to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol.* 104: 1015-1023.
- Jain N., Nguyen H., Friedline R.H., Malhotra N., Brehm M., Koyanagi M., Bix M., Cooper J.A., Chambers C.A., Kang J. (2009). Cutting edge: Dab2 is a FOXP3 target gene required for regulatory T cell function. *J Immunol.* 183(7): 4192-4196.
 - Jin L., Batra S., Douda D.N., Palaniyar N., Jeyaseelan S. (2014). CXCL1 contributes to host defense in polymicrobial sepsis via modulating T cell and neutrophil functions. *J Immunol.* 193(7): 3549-3558.
 - Johnson M.A., Perez-Amador M.A., Lidder P., Green P.J. (2000). Mutants of Arabidopsis defective in a sequence-specific mRNA degradation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(25): 13991-13996.
 - Jones S.M., Pons L., Roberts J.L., Scurlock A.M., Perry T.T., Kulis M., Shreffler W.G., Steele P., Henry K.A., Adair M., Francis J.M., Durham S., Vickery B.P., Zhong X., Burks A.W. (2009). Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 124(2): 292-300.
 - Jurado M.J. Vacunas de ADN en el tratamiento de alergia. AVANCES PEDIÁTRICOS. BSCP Can Ped 2001; 25- nº 1.
 - Jutel M., Akdis M., Budak F., Aebischer-Casaulta C., Wrzyszc M., Blaser K., Akdis C.A. (2003). IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol.* 33(5): 1205-1214.
 - Jutel M., Jaeger L., Suck R., Meyer H., Fiebig H., Cromwell O. (2005). Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 116: 608-613.
 - Jutel M., Akdis M., Blaser K., Akdis C.A. (2006). Mechanisms of allergen specific immunotherapy T-cell tolerante and more. *Allergy.* 61: 796-807.
 - Jutel M., Akdis C.A. (2014). Novel immunotherapy vaccine development. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 14(6): 557-563.
 - Kaku Y., Imaoka H., Morimatsu Y., Komohara Y., Ohnishi K., Oda H., Takenaka S., Matsuoka M., Kawayama T., Takeya M., Hoshino T. (2014). Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on alveolar macrophages in the lungs of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One.* 9(1): e87400.
 - Kalesnikoff J., Galli S.J. (2008). New developments in mast cell biology. *Nat Immunol.* 9: 1215-1223.
 - Kashyap M., Thornton A.M., Norton S.K., Barnstein B., Macey M., Brenzovich J., Shevach E., Leonard W.J., Ryan J.J. (2008). Cutting edge: CD4 T cell-mast cell interactions alter IgE receptor expression and signaling. *J Immunol.* 180: 2039-2043.

- Kendzierski C.M., Irizarry R.A., Chen K.S., Haag J.D., Gould M.N. (2005). On the utility of pooling biological samples in microarray experiments. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(12): 4252-4257.
- Kim J.W., Dang C.V. (2005) Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci*. 30(3): 142-150.
- King T.P., Norman P.S., Conell J.T. (1964). Isolation and characterization of allergens from ragweed pollen II. *Biochemistry*. 3: 458-468.
- King T.P., Hoffman D., Löwenstein H., Marsh D.G., Platts-Mills T.A.E., Thomas W. (1994). Allergen nomenclature. *Bull. WHO*. 72, 797.
- Kingo K, Mössner R., Rätsep R., Raud K., Krüger U., Silm H., Vasar E., Reich K., Kõks S. (2008). Association analysis of IL20RA and IL20RB genes in psoriasis. *Genes Immun*. 9(5): 445-451.
- Kirmaz C., Ozenturk Kirgiz O., Bayrak P., Yilmaz O., Vatansever S., Ozbilgin K., Onur E., Celik O., Sogut A., Ay G., Yuksel H. (2011). Effects of allergen-specific immunotherapy on functions of helper and regulatory T cells in patients with seasonal allergic rhinitis. *Eur Cytokine Netw*. 22(1): 15-23.
- Kobayashi H., Horner A.A., Takabayashi K., Nguyen M.D., Huang E., Cinman N., Raz E. (1999). Immunostimulatory DNA prepriming: a novel approach for prolonged Th1-biased immunity. *Cell Immunol*. 198: 69-75.
- Kong W.J., Chen Wang Y. (2012). A population-based 5-year follow-up of allergic rhinitis in Chinese children. *Am J Rhinol Allergy*. 26(4): 315-320.
- Krause K., Metz M., Makris M., Zuberbier T., Maurer M. (2012). The role of interleukin-1 in allergy-related disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 12(5): 477-484.
- Kroeger E., Stephens N.L. (1971). Effect of hypoxia on energy and calcium metabolism in airway smooth muscle. *Am J Physiol*. 220: 1199-1204.
- Kucharczyk A., Jahnz-Różyk K., Targowski T., Kucharczyk P., Owczarek W., Grabowska-Krawiec P. (2010). Evaluation of CCL22 and CCL17 concentrations in patients sensitized to grass pollen grains during specific immunotherapy. *Int Rev Allergol Clin Immunol*. 16(3-4): 63-70.
- Kuchroo V.K., Das M.P., Brown J.A., Ranger A.M., Zamvil S.S., Sobel R.A., Weiner H.L., Nabavi N., Glimcher L.H. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell*. 80: 707-718.
- Kucuksezer U.C., Ozdemir C., Akdis M., Akdis C.A. (2013). Mechanisms of immune tolerance to allergens in children. *Korean J Pediatr*. 56(12): 505-513.
- Kuehr J., Brauburger J., Zielen S., Schauer U., Kamin W., Von Berg A., Leupold W., Bergmann K.C., Rolinck-Werninghaus C., Gräve M., Hultsch T., Wahn U. (2002). Efficacy of combination treatment with antiIgE plus specific immunotherapy in polysensitized children and adolescents with seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 109: 274-280.

- Kündig T.M., Senti G., Schnetzler G., Wolf C., Prinz Vavricka B.M., Fulurija A., Hennecke F., Sladko K., Jennings G.T., Bachmann M.F. (2006). Der p 1 peptide on virus-like particles is safe and highly immunogenic in healthy adults. *J Allergy Clin Immunol.* 117: 1470-1476.
- Kurt E., Aktas A., Gulbas Z., Erginel S., Arslan S. (2010). The effects of natural pollen exposure on inflammatory cytokines and their relationship with nonspecific bronchial hyperresponsiveness in seasonal allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc.* 31(2): 126-131.
- Lahoz C., Lauzurica P., Tricas L., Diez R., Maruri N., Galocha B., Florez R., Maestre Y., Gurbindo C., Garcia R. (1985). A glycoprotein as the major antigen in *Olea europaea*. *Ann Allergy.* 55: 289.
- Lal G., Bromberg J.S. (2009). Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood.* 114(18): 3727-3735.
- Larché M. (2001). Inhibition of human T-cell responses by allergen peptides. *Immunology.* 104: 77-82.
- Larché M., Wraith D.C. (2005). Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases. *Nat Med.* 11(4 Suppl.): S69– S76.
- Larché M., Akdis C. A., Valenta R. (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 6(10): 761-771.
- Larché M. (2007). Peptide immunotherapy for allergic diseases. *Allergy.* 62: 325–331.
- Larché M. (2014). Mechanisms of Peptide immunotherapy in allergic airways disease. *Ann Am Thorac Soc.* 11 Suppl 5: S292-2966.
- Lauriello M., Micera A., Muzi P., Di Rienzo Businco L., Bonini S. (2012). TLR4 and TLR9 expression in different phenotypes of rhinitis. *Int J Otolaryngol.* 925164.
- Lauzurica P., Gurbindo C., Maruri N., Galocha B., Díaz R., González J., García R., Lahoz, C. (1988). Olive (*Olea europaea*) pollen allergens-I. Immunochemical characterization by immunoblotting, CRIE and immunodetection by a monoclonal antibody. *Mol Immunol.* 25: 329-335.
- Lenschow D.J., Ho S.C., Sattar H., Rhee L., Gray G., Nabavi N., Herold K.C., Bluestone J.A. (1995). Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Exp Med.* 181: 1145– 1155.
- Leonardi S., Arena A., Bruno M.E., Cannaò P.M., D'Anneo R.W., Falagiani P., Gammeri E., Mistrello G., Nicolini A., Ricciardi L., Valenti G., Longo R., La Rosa M. (2010). *Olea* sublingual allergoid immunotherapy administered with two different treatment regimens. *Allergy Asthma Proc.* 31(2): e25-29.
- Lewis C.C., Aronow B., Hutton J., Santeliz J., Dienger K., Herman N., Finkelman F.D., Wills-Karp M. (2009). Unique and overlapping gene expression patterns driven by IL-4 and IL-13 in the mouse lung. *J Clin Immunol.* 123(4): 795-804.

- Li M.O., Flavell R.A. (2008). Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity*. 28: 468–476.
- Li X., Montine K.S., Keene C.D., Montine T.J. (2015). Different mechanisms of apolipoprotein E isoform-dependent modulation of prostaglandin E2 production and triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) expression after innate immune activation of microglia. *FASEB J*. pii: fj.14-262683.
- Liccardi G., D'Amato M., D'Amato G. (1996). Oleaceae pollinosis: a review. *Int Arch Allergy Immunol*. 111(3): 210-217.
- Ling E.M., Smith T., Nguyen X.D., Pridgeon C., Dallman M., Arbery J., Carr V.A., Robinson D.S. (2004). Relation of CD4+CD25+ regulatory T cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*. 363: 608-615.
- Liu Y.C. (2004). Ubiquitin ligases and the immune response. *Annu Rev Immunol*. 22: 81-127.
- Liu Y.C. (2007). The E3 ubiquitin ligase Itch in T cell activation, differentiation, and tolerance. *Seminars Immunol*. 19(3): 197-205.
- Llanes E., Quiralte J., López E., Sastre B., Chacártégui M., del Pozo V., Palomino P., Lahoz C., Cárdena B. (2009). Analysis of polymorphisms in olive pollen allergy: IL13, IL4RA, IL5 and ADRB2 genes. *Int Arch Allergy Immunol*. 148(3): 228-238.
- Lloyd C.M., Hawrylowicz C.M. (2009) Regulatory T cells in asthma. *Immunity*. 31(3): 438-449.
- Lombardero M., Quirce S., Duffort O., Barber D., Carpizo J., Chamorro M.J., Lezaun A., Carreira J. (1992). Monoclonal antibodies against Olea europaea major allergen: allergenic activity of affinity-purified allergen and depleted extract and development of a radioimmunoassay for the quantitation of the allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 89(4): 884-894.
- Lombardi C., Incorvaia C., Braga M., Senna G., Canonica G.W., Passalacqua G. (2009). Administration regimens for sublingual immunotherapy to pollen allergens: what do we know? *Allergy*. 64: 849-854.
- Loveless M.H. (1940). Immunological studies of pollinosis. I. The presence of two antibodies related to the same pollen antigen in the serum of treated hay-fever patients. *J Immunol*. 38: 25-50
- Lu L.F., Thai T.H., Calado D.P., Chaudhry A., Kubo M., Tanaka K., Loeb G.B., Lee H., Yoshimura A., Rajewsky K., Rudensky A.Y. (2009). Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity*. 30(1): 80-91.
- Lue K.H., Lin Y.H., Sun H.L., Lu K.H., Hsieh J.C., Chou M.C. (2006). Clinical and immunologic effects of sublingual immunotherapy in asthmatic children sensitized to mites: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Pediatr Allergy Immunol*. 17: 408-415.
- Macchia L., Caiaffa M.F., D'Amato Tursi A. (1991). Allergenic significance of Oleaceae pollen. Allergenic pollen and pollinosis in Europe. *London: Blackwell scientific Publications*: 87-93.

- Magone M.T., Chan C.C., Beck L., Whitcup S.M., Raz E. (2000). Systemic or mucosal administration of immunostimulatory DNA inhibits early and late phases of murine allergic conjunctivitis. *Eur J Immunol.* 30: 1841–1850.
- Maheaswari R., Sivasankar K., Subbarayan S. (2014). Toll gates: An emerging therapeutic target. *J Indian Soc Periodontol.* 18(6): 686-692.
- Malley A., Perlman F. (1969). Induction of both reaginic and blocking antibodies with a low molecular weight fraction of timothy pollen extract. *J Allergy.* 43: 59-64.
- Mandarapu R., Ajumeera R., Venkatesan V., Prakhya BM. (2014). Proliferation and TH1/TH2 cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells after treatment with cypermethrin and mancozeb in vitro. *J Toxicol.* 308286.
- Manousis T., Moore N.F. (1988). Exploited Plants. *Olive Tree Biologist.* 35: 7-12.
- Marazuela E.G., Rodríguez R., Barber D., Villalba M., Batanero E. (2007). Hypoallergenic mutants of Ole e 1, the major olive pollen allergen, as candidates for allergy vaccines. *Clin Exp Allergy.* 37: 251-260.
- Marazuela E.G., Prado N., Moro E., Fernández-García H., Villalba M., Rodríguez R., Batanero E. (2008a). Intranasal vaccination with poly(lactide-co-glycolide) microparticles containing a peptide T of Ole e 1 prevents mice against sensitization. *Clin Exp Allergy.* 38(3): 520-528.
- Marazuela E.G., Rodríguez R., Fernández-García H., García M.S, Villalba M., Batanero E. (2008b). Intranasal immunization with a dominant T-cell epitope peptide of major allergen of olive pollen prevents mice from sensitization to the whole allergen. *Mol Immunol.* 45: 438-445.
- Marazuela E.G., Hajek R., Villalba M., Barber D., Breiteneder H., Rodríguez R., Batanero E. (2012). A non-allergenic Ole e 1-like protein from birch pollen as a tool to design hypoallergenic vaccine candidates. *Mol Immunol.* 50(1-2): 83-90.
- Maresso K., Broeckel, U. (2008). Genotyping Platforms for MassThroughput Genotyping with SNPs, Including Human Genome-Wide Scans. *Adv Genet.* 60: 107-139.
- Marshall J.D., Abtahi S., Eiden J.J., Tuck S., Milley R., Haycock F., Reid M.J., Kagey-Sobotka A., Creticos P.S., Lichtenstein L.M., Van Nest G. (2001). Immunostimulatory sequence DNA linked to the Amb a 1 allergen promotes T(H)1 cytokine expression while downregulating T(H)2 cytokine expression in PBMCs from human patients with ragweed allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 108: 191-197.
- Marth K., Focke-Tejkl M., Lupinek C., Valenta R., Niederberger V. (2014). Allergen Peptides, Recombinant Allergens and Hypoallergens for Allergen-Specific Immunotherapy. *Curr Treat Options Allergy.* 26(1): 91-106.
- Martín-Orozco E., Cárdbaba B., del Pozo V., de Andrés B., Villalba M., Gallardo S., Rodríguez-García M.I., Fernández M.C., Alché J.D., Rodríguez R. (1994). Ole e I: epitope mapping, cross-reactivity with other *Oleaceae* pollens and ultrastructural localization. *Int Arch Allergy Immunol.* 104(2): 160-170.

- Massanari M., Nelson H., Casale T., Busse W., Kianifard F., Geba G.P., Zeldin R.K. (2010). Effect of pretreatment with omalizumab on the tolerability of specific immunotherapy in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 125(2): 383-389.
- Matsumoto Y., Imai Y., Sugita Y., Tanaka T., Tsujimoto G., Saito H., Oshida T. (2010). CCDC132 is highly expressed in atopic dermatitis T cells. *Mol Med Rep.* 3(1): 83-87.
- Mayr B., Montminy M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(8): 599-609.
- Mazur G., Baur X., Liebers V. (1990). Hypersensitivity to hemoglobins of the Diptera family Chironomidae: Structural and functional studies of their immunogenic/allergenic sites. *Monogr Allergy.* 28: 121-137.
- McGeachy M.J., Bak-Jensen K.S., Chen Y., Tato C.M., Blumenschein W., McClanahan T., Cua D.J. (2007). TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol.* 8(12): 1390-1397.
- Medina I., Carbonell J., Pulido L., Madeira S.C., Goetz S., Conesa A., Tárraga J., Pascual-Montano A., Nogales-Cadenas R., Santoyo J., García F., Marbà M., Montaner D., Dopazo J. (2010). Babelomics: an integrative platform for the analysis of transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling. *J Nucleic Acids.* (Web server issue): W210-213.
- Meiler F., Klunker S., Zimmermann M., Akdis C.A., Akdis M. (2008a). Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy.* 63: 1455-1463.
- Meiler F., Zumkehr J., Klunker S., Ruckert B., Akdis C.A., Akdis M. (2008b). In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J Exp Med.* 205: 2887-2898.
- Milani M., Pecora S., Rainbow Study Investigator Group. (2011). Clinical relevance of non-grass pollens respiratory allergies in Italy and effects of specific sublingual immunotherapy: The Rainbow Trial, a multicentre 3-year prospective observational study. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 43(4): 111-116.
- Mobini R., Andersson B.A., Erjefält J., Hahn-Zoric M., Langston M.A., Perkins A.D., Cardell L.O., Benson M. (2009). A module-based analytical strategy to identify novel disease-associated genes shows an inhibitory role for interleukin 7 Receptor in allergic inflammation. *BMC Systems Biology.* 3: 19.
- Moed H., Gerth van Wijk R., Hendriks R.W., van der Wouden J.C. (2013). Evaluation of Clinical and Immunological Responses: A 2-Year Follow-Up Study in Children with Allergic Rhinitis due to House Dust Mite. *Mediators Inflamm.* 345217-345225.
- Moingeon P., Batard T., Fadel R., Frati F., Sieber J., Van Overtvelt L. (2006). Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy.* 61: 151-165.
- Moingeon P., Mascarell L. (2012). Induction of tolerance via the sublingual route: mechanisms and applications. *Clin Dev Immunol.* 2012: ID: 623474.

- Montaner D., Dopazo J. (2010). Multidimensional gene set analysis of genomic data. *PLoS One*. 5(4): e10348.
- Moldaver D., Larché M. (2011). Immunotherapy with peptides. *Allergy*. 66: 784–791.
- Morettini A., Pulsell A. (1953). L’Azione del vento nel trasporto del polline dell’olivo. *Annali della Speri Agraria (N.W) Roma*.
- Mori A., Kaminuma O., Suko M., Mikami T., Nishizaki Y., Ohmura T., Hoshino A., Asakura Y., Miyazawa K., Ando T., Okumura Y., Yamamoto K., Okudaira H. (1997). Cellular and molecular mechanisms of IL-5 synthesis in atopic disease: a study with allergen-specific human helper T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 100: S56–64.
- Moverare R., Elfman L., Bjornsson E., Stalenheim G. (2000a). Changes in cytokine production in vivo during early phase of birch-pollen immunotherapy. *Scand J Immunol*. 52: 200-206.
- Müller U., Akdis C.A., Fricker M., Akdis M., Blesken T., Bettens F., Blaser K. (1998). Immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom. *J Allergy Clin Immunol*. 101(6 Pt 1): 747–754.
- Müller U.R., Helbling A., Bischof M. (1989). Predictive value of venom-specific IgE, IgG and IgG subclass antibodies in patients on immunotherapy with honey bee venom. *Allergy*. 44: 412-418.
- Mygind N., Dahl R., Perdensen S. (1996). Therstrup-Pedersen, K. Allergens. *Essential Allergy* p.81.
- Nagalakshmi M.L., Murphy E., McClanahan T., de Waal Malefyt R. (2004). Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization. *Int Immunopharmacol*. 4: 577–592.
- Nair P., Pizzichini M.M., Kjarsgaard M., Inman M.D., Efthimiadis A., Pizzichini E., Hargreave F.E., O’Byrne P.M. (2009). Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. *N Engl J Med*. 360(10): 985-993.
- Natarajan P., Guernsey L.A., Schramm C.M. (2014). Regulatory B cells in allergic airways disease and asthma. *Methods Mol Biol*. 1190: 207-225.
- Noh J., Lee J.H., Noh G., Bang S.Y., Kim H.S., Choi W.S., Cho S., Lee S.S. (2010). Characterisation of allergen-specific responses of IL-10-producing regulatory B cells (Br1) in Cow Milk Allergy. *Cell Immunol*. 264: 143–149.
- Noh G., Lee J.H. (2011). Regulatory B cells and allergic diseases. *Allergy Asthma Immunol Res*. 3(3): 168-177.
- Nonaka M., Pawankar R., Fukumoto A., Yagi T. (2008). Heterogeneous response of nasal and lung fibroblasts to transforming growth factor-beta 1. *Clin Exp Allergy*. 38: 812–821.
- Noon L. (1911). Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet*. 1: 1572-1583.

- Norman P.S., Ohman J.L. Jr., Long A.A., Creticos P.S., Geftter M.A., Shaked Z., Wood R.A., Eggleston P.A., Hafner K.B., Rao P., Lichtenstein L.M., Jones N.H., Nicodemus C.F. (1996). Treatment of cat allergy with T-cell reactive peptides. *Am J Respir Crit Care Med.* 154(6 Pt 1): 1623-1628.
- Norman P.S. (2004). Immunotherapy: 1999-2004. *J Allergy Clin Immunol.* 113: 1013-1023.
- Nouri-Aria K.T., Wachholz P.A., Francis J.N., Jacobson M.R., Walker S.M., Wilcock L.K., Staple S.Q. (2004). Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol.* 172(5): 3252-3259.
- Novak N., Bieber T., Allam J.P. (2011). Immunological mechanisms of sublingual allergen-specific immunotherapy. *Allergy.* 66: 733-739.
- Novak N., Mete N., Bussmann C., Maintz L., Bieber T., Akdis M., Zumkehr J., Jutel M., Akdis C. (2012). Early suppression of basophil activation during allergen-specific immunotherapy by histamine receptor 2. *J Allergy Clin Immunol.* 130: 1153-1158.
- O'Hehir R.E., Yssel H., Verma S., De Vries J.E., Spits H., Lamb J.R. (1991). Clonal analysis of differential lymphokine production in peptide and superantigen induced T cell anergy. *Int Immunol.* 3 Suppl: 819-826.
- Obispo T.M., Melero J.A., Carpizo J.A., Carreira J., Lombardero M. (1993). The main allergen of *Olea europaea* (Ole e 1) is also present in other species of the Oleaceae family. *Clin Exp Allergy.* 23(4): 311-316.
- Ohme-Takagi M., Taylor C.B., Newman T.C., Green P.J. (1993). The effect of sequences with high AU content on mRNA stability in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90(24): 11811-11815.
- Oldfield W.L., Kay A.B., Larché M. (2001). Allergen-derived T cell peptide-induced late asthmatic reactions precede the induction of antigen-specific hyporesponsiveness in atopic allergic asthmatic subjects. *J Immunol.* 167: 1734-1739.
- Oldfield W.L., Larché M., Kay A.B. (2002). Effect of T-cell peptides derived from Fel d 1 on allergic reactions and cytokine production in patients sensitive to cats: a randomized controlled trial. *Lancet.* 360: 47-53.
- Ooi J., Hayden M.R., Pouladi M.A. (2014). Inhibition of Excessive Monoamine Oxidase A/B Activity Protects Against Stress-induced Neuronal Death in Huntington Disease. *Mol Neurobiol.* 2014 [Epub ahead of print].
- Oral H.B., Kotenko S.V., Yilmaz M., Mani O., Zumkehr J., Blaser K., Akdis C.A., Akdis M. (2006). Regulation of T cells and cytokines by the interleukin-10 (IL-10)-family cytokines IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26. *Eur J Immunol.* 36: 380-388.
- Orovitg A. (2013). Unidad 2: Polen de olea. Los aeroalérgenos como factor condicionante de la alergia respiratoria. Esteve.

- Ozdemir C., Yazı D., Gocmen I., Yesil O., Aydogan M., Semic-Jusufagic A., Bahceciler N.N., Barlan I.B. (2007). Efficacy of long-term sublingual immunotherapy as an adjunct to pharmacotherapy in house dust mite allergic children with asthma. *Pediatr Allergy Immunol.* 18: 508-515.
- Pacciani V., Gregori S., Chini L., Corrente S., Chianca M., Moschese V., Rossi P., Roncarolo M.G., Angelini F. (2010). Induction of anergic allergen-specific suppressor T cells using tolerogenic dendritic cells derived from children with allergies to house dust mites. *J Allergy Clin Immunol.* 125(3): 727-736.
- Palomares O., Swoboda I., Villalba M., Balic N., Spitzauer S., Rodríguez R., Valenta R. (2006). The major allergen of olive pollen Ole e 1 is a diagnostic marker for sensitization to Oleaceae. *Int Arch Allergy Immunol.* 141(2): 110-118.
- Palomares O., Yaman G., Azkur A.K., Akkoc T., Akdis M., Akdis C.A. (2010). Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol.* 40: 1232-1240.
- Palomares O., Martín-Fontecha M., Lauener R., Traidl-Hoffmann C., Cavkaytar O., Akdis M., Akdis C.A. (2014). Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF- β Genes. *Genes Immun.* 15(8): 511-520.
- Park Y., Jin H.S., Aki D., Lee J., Liu Y.C. (2014). The ubiquitin system in immune regulation. *Adv Immunol.* 124: 17-66.
- Passalacqua G., Albano M., Riccio A., Fregonese L., Puccinelli P., Parmiani S., Canonica G.W. (1999). Clinical and immunologic effects of a rush sublingual immunotherapy to *Parietaria* species: a double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol.* 104: 964-968.
- Pauli G., Larsen T.H., Rak S., Horak F., Pastorello E., Valenta R., Purohit A., Arvidsson M., Kavina A., Schroeder J.W., Mothes N., Spitzauer S., Montagut A., Galvain S., Melac M., André C., Poulsen L.K., Malling H.J. (2008). Efficacy of recombinant birch pollen vaccine for the treatment of birch-allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol.* 122: 951-960.
- Pflanz S., Timans J.C., Cheung J., Rosales R., Kanzler H., Gilbert J., Hibbert L., Churakova T., Travis M., Vaisberg E., Blumenschein W.M., Mattson J.D., Wagner J.L., To W., Zurawski S., McClanahan T.K., Gorman D.M., Bazan J.F., de Waal Malefyt R., Rennick D., Kastelein R.A. (2002). IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4 T cells. *Immunity.* 16: 779-790.
- Platts-Mills T., Vaughan J., Squillace S., Woodfolk J., Sporik R. (2001). Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population based cross sectional study. *Lancet.* 357: 752-756.
- Pomés A., Villalba M. (1995). Alérgenos. Tratado de Alergología Ed. Ignacio Dávila. SEAIC. 3-26.
- Poole J.A., Anderson L., Gleason A.M., West W.W., Romberger D.J., Wyatt T.A. (2015). Pattern recognition scavenger receptor A/CD204 regulates airway inflammatory homeostasis following organic dust extract exposures. *J Immunotoxicol.* 12(1): 64-73.

- Pope R.M., Shahrara S. (2013). Possible roles of IL-12-family cytokines in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 9(4): 252-256.
- Prado N., Marazuela E.G., Segura E., Fernández-García H., Villalba M., Théry C., Rodríguez R., Batanero E. (2008). Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction. *J Immunol*. 181(2): 1519-1525.
- Prevede N., Salzano F.A., Rossi F.W., Rivellese F., Dellepiane M., Guastini L., Mora R. (2011). Role(s) of formyl-peptide receptors expressed in nasal epithelial cells. *J Biol Regul Homeost Agents*. 25(4): 553-564.
- Prieto M., Rivas J.V., López-Novoa J.M., Pérez-Barriocanal F. (2002). El TGF- β : síntesis y mecanismo de acción. *Nefrología*. 22(2): 135-143.
- Probst-Kepper M., Geffers R., Kröger A., Viegas N., Erck C., Hecht H.J., Lünsdorf H., Roubin R., Moharreggh-Khiabani D., Wagner K., Ocklenburg F., Jeron A., Garritsen H., Arstila T.P., Kekäläinen E., Balling R., Hauser H., Buer J., Weiss S. (2009). GARP: a key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells. *J Cell Mol Med*. 13(9B): 3343-3357.
- Quiralte J., Llanes E., Barral P., Arias de Saavedra J.M., Sáenz de San Pedro B., Villalba M., Florido J.F., Rodríguez R., Lahoz C., Cárdbaba B. (2005). Ole e 2 and Ole e 10: new clinical aspects and genetic restrictions in olive pollen allergy. *Allergy*. 60(3): 360-365.
- Quiralte J., Palacios L., Rodríguez R., Cárdbaba B., Arias de Saavedra J.M., Villalba M., Florido J.F., Lahoz C. (2007). Modelling diseases: the allergens of *Olea europaea* pollen. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 17 Suppl 1: 24-30.
- Radman M., Golshiri A., Shamsizadeh A., Zainodini N., Bagheri V., Arababadi M.K., Kennedy D. (2014). Toll-like receptor 4 plays significant roles during allergic rhinitis. *Allergol Immunopathol (Madr)*. pii: S0301-0546(14)00100-1. doi: 10.1016/j.aller. 2014. 04. 006.
- Radulovic S., Jacobson M.R., Durham S.R., Nouri-Aria K.T. (2008). Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+CD25+ cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol*. 12(6)1: 1467-1472.
- Rak S., Lowhagen O., Vnege P. (1998). The effect of immunotherapy on bronchial hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein in pollen-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 82: 470-480.
- Rallo L., Barranco D., Caballero J.M., del Rio C., Martín A., Tous J., Trujillo I. (2005) (Eds.). *Variedades de Olivo en España*. Junta de Andalucía- MAPA- Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Rankin J.A., Picarella D.E., Geba G.P., Temann U.A., Prasad B., DiCosmo B. (1996). Phenotypic and physiologic characterization of transgenic mice expressing interleukin 4 in the lung: lymphocytic and eosinophilic inflammation without airway hyperreactivity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(15): 7821-7825.
- Raulf-Heimsoth M. (2008). T Cell-Primary Culture from Peripheral Blood. *Methods Mol Med*. 138: 17-30.

- Raz E., Tighe H., Sato Y., Corr M., Dudler J.A., Roman M., Swain S.L., Spiegelberg H.L., Carson D.A. (1996). Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 5141–5145.
- Ricciotti E., Fitzgerald G.A. (2011). Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 31(5): 986-1000.
- Richardson J.D., Vaski M.R. (2002). Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*. 302(3): 839-845.
- Ring S., Schafer S.C., Mahnke K., Lehr H.A., Enk A.H. (2006). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *Eur J Immunol*. 36: 2981–2992.
- Rodríguez R., Villalba M., Monsalve R.I., Batanero E. (2001). The spectrum of olive pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 125: 185-195.
- Rodríguez R., Villalba M., Batanero E., González E.M., Monsalve R.I., Huecas S., Tejera M.L., Ledesma A. (2002). Allergenic diversity of the olive pollen. *Allergy*. 57 Suppl 71: 6-16.
- Rodríguez R., Villalba M., Batanero E., Palomares O., Quiralte J., Salamanca G., Sirvent S., Castro L., Prado N. (2007). Olive pollen recombinant allergens: value in diagnosis and immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 17 Suppl 1: 4-10.
- Rudensky A.Y. (2011). Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev*. 241(1): 260-268.
- Sääf A.M., Tengvall-Linder M., Chang H.Y., Adler A.S., Wahlgren C.F., Scheynius A., Nordenskjöld M., Bradley, M. (2008). Global expression profiling in atopic eczema reveals reciprocal expression of inflammatory and lipid genes. *PLoS One*. 3(12): e4017.
- Sahoo A., Im S.H. (2012). Molecular Mechanisms Governing IL-24 Gene Expression. *Immune Netw*. 12(1): 1-7.
- Sakaguchi S., Wing K., Yamaguchi T. (2009). Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *Eur J Immunol*. 39(9): 2331–2336.
- Sartor M.A., Leikauf G.D., Medvedovic M. (2009). LRpath: a logistic regression approach for identifying enriched biological groups in gene expression data. *Bioinformatics*. 25(2): 211-217.
- Sastre J., Landivar M.E., Ruiz-García M., Andregnette-Rosigno M.V., Mahillo I. (2012). How molecular diagnosis can change allergen-specific immunotherapy prescription in a complex pollen area. *Allergy*. 67: 709-711.
- Sastre J. (2013). Molecular diagnosis and immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 13(6): 646-650.
- Scadding G.W., Shamji M.H., Jacobson M.R., Lee D.I., Wilson D., Lima M.T, Pitkin L., Pilette C., Nouri-Aria K., Durham S.R. (2010). Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific

- immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B cells. *Clin Exp Allergy*. 40: 598–606.
- Scadding G. (2014). Cytokine profiles in allergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 14(5): 435.
 - Schandane L., Alonso-Vega C., Willems F., Gerard C., Delvaux A., Velu T., Devos R., de Boer M., Goldman M. (1994). B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J Immunol*. 152: 4368- 4374.
 - Schramm G., Kahlert H., Suck R., Weber B., Stüwe H.T., Müller W.D., Bufe A., Becker W.M., Schlaak M.W., Jäger L., Cromwell O., Fiebig H. (1999). Allergen engineering: variants of the timothy grass pollen allergen Phl p 5b with reduced IgE-binding capacity but conserved T cell reactivity. *J Immunol*. 162(4): 2406-2414.
 - Schreffer W., Lencer D., Bardina L., Sampson H. (2005). Epitope mapping by microarray peptide immunoassay and cluster analysis reveals interpatient heterogeneity and a more detailed map. *Clin Immunol*. 116(4): 893899.
 - Schroder W.A., Le T.T., Major L., Street S., Gardner J., Lambley E., Markey K., MacDonald K.P., Fish R.J., Thomas R., Suhrbier A. (2010). A physiological function of inflammation-associated SerpinB2 is regulation of adaptive immunity. *J Immunol*. 184(5): 2663-2670.
 - Schroder W.A., Major L., Suhrbier A. (2011). The role of SerpinB2 in immunity. *Crit Rev Immunol*. 31(1): 15-30.
 - Scranton S.E., González E.G., Waibel K.H. (2009). Incidence and characteristics of biphasic reactions after allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 123: 493-498.
 - Senti G., Prinz-Vavricka B.M., Erdmann I., Diaz M.I., Markus R., McCormack S.J., Simard J.J., Wüthrich B., Cramer R., Graf N., Johansen P., Kündig T.M. (2008). Intralymphatic allergen administration renders specific immunotherapy faster and safer: a randomized controlled trial. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 17908–17912.
 - Senti G., Cramer R., Kuster D., Johansen P., Martinez-Gomez J.M., Graf N., Steiner M., Hothorn L.A., Grönlund H., Tivig C., Zaleska A., Soyer O., van Hage M., Akdis C.A., Akdis M., Rose H., Kündig T.M. (2012). Intralymphatic immunotherapy for cat allergy induces tolerance after only 3 injections. *J Allergy Clin Immunol*. 129: 1290–1296.
 - Serrano P. (2007) *Sensibilización a alérgenos minoritarios de Olea europaea como causa de reacciones sistémicas por inmunoterapia alérgeno-específica [Tesis Doctoral]*. Córdoba (España): Universidad de Córdoba.
 - Shakib F., Furmonaviciene R. (2000). The significance of enzymic and other biological activities of proteins in relation to their capacity to serve as allergens. *Clin Exp Allergy*. 30(8): 1056-1057.
 - Sharif O., Knapp S. (2008). From expression to signaling: roles of TREM-1 and TREM-2 in innate immunity and bacterial infection. *Immunobiology*. 213(9-10): 701-713.

- Shevach E.M. (2012). Application of IL-2 therapy to target T regulatory cell function. *Trends Immunol.* 33(12): 626-32.
- Shim J.Y., Kim B.S., Cho S.H., Min K.U., Hong S.J. (2003). Allergen-specific conventional immunotherapy decreases immunoglobulin e-mediated basophil histamine releasability. *Clin Exp Allergy.* 33: 52-57.
- Sibbald B., Horn M.E.C., Gregg I. (1980). A family study of the genetic basis of asthma and wheezy bronchitis. *Arch Dis Child.* 55(5): 354-357.
- Simms E., Kjarsgaard M., Denis S., Hargreave F.E., Nair P., Larché M. (2013). Cytokine responses of peripheral blood mononuclear cells to allergen do not identify asthma or asthma phenotypes. *Clin. Exp. Allergy.* 43: 1226–1235.
- Simons F.E. (2010). Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 125: S161-181.
- Skitarelić N., Skitarelić N. (2009). Hypersensitivity to the pollen of *Olea europea* in the Mediterranean area. *Arh Hig Rada Toksikol.* 60(2): 259-60.
- Sogut A., Yilmaz O., Kirmaz C., Ozbilgin K., Onur E., Celik O., Pinar E., Vatansever S., Dinc G., Yuksel H. (2012). Regulatory-T, T-helper 1, and T-helper 2 cell differentiation in nasal mucosa of allergic rhinitis with olive pollen sensitivity. *Int Arch Allergy Immunol.* 157 (4): 349-353.
- Soref C.M., Di Y.P., Hayden L., Zhao Y.H., Satre M.A., Wu R.J. (2001). Characterization of a novel airway epithelial cell-specific short chain alcohol dehydrogenase/reductase gene whose expression is up-regulated by retinoids and is involved in the metabolism of retinol. *J Biol Chem.* 276(26): 24194-24202.
- Sosa- Garroso M., Macías-Silva N. (2004). El factor de crecimiento transformante Beta (TGF-β): Funciones y vías de transducción. *REB.* 23(1): 3-11.
- Soyer O.U., Akdis M., Ring J., Behrendt H., Cramer R., Lauener R., Akdis C.A. (2013). Mechanisms of peripheral tolerance to allergens. *Allergy.* 68(2): 161-170.
- Stahl H.F., Fauti T., Ullrich N., Bopp T., Kubach J., Rust W., Labhart P., Alexiadis V., Becker C., Hafner M., Weith A., Lenter M.C., Jonuleit H., Schmitt E., Mennerich D. (2009). miR-155 inhibition sensitizes CD4+ Th cells for TREG mediated suppression. *PLoS One.* 4(9):e7158.
- Starner T.D., Barker C.K., Jia H.P., Kang Y., McCray P.B. Jr. (2003). CCL20 is an inducible product of human airway epithelia with innate immune properties. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 29(5): 627-633.
- Strait R.T., Morris S.C., Finkelman F.D. (2006). IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis *in vivo* through both antigen interception and Fc gamma R11b cross-linking. *J Clin Invest.* 116: 833-841.
- Suarez-Fueyo A., Ramos T., Galan A., Jimeno L., Wurtzen P.A., Marin A., de Frutos C., Blanco C., Carrera A.C., Barber D., Varona R. (2014). Grass tablet sublingual immunotherapy downregulates the TH2 cytokine response followed by regulatory T-cell generation. *J Allergy Clin Immunol.* 133: 130–138 e1-2.

- Subiza F.J. (2007). Recuento de pólenes. En: Pelaez A, Dávila I, eds. Tratado de Alergología. Madrid. *Ergon*: 415-24.
- Subramaniana A., Tamayoa P., Moothaa V.K., Mukherjeed S., Eberta B.L., Gillette M.A., Paulovichg A., Pomeroyh S.L., Goluba T.R., Landera E. S., Mesirova J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledgebased Approach for interpreting genome-wide expression profiles. *PNAS*. 25; 102(43): 15545-15550.
- Takabayashi K., Libet L., Chisholm D., Zubeldia J., Horner A.A. (2003). Intranasal immunotherapy is more effective than intradermal immunotherapy for the induction of airway allergen tolerance in Th2-sensitized mice. *J Immunol*. 170(7): 3898-3905.
- Tang W., Ezcurra I., Muschietti J., McCormick S. (2002). A cysteine-rich extracellular protein, LAT52, interacts with the extracellular domain of the pollen receptor kinase LePRK2. *Plant Cell*. 14(9): 2277-2287.
- Tarzi M., Klunker S., Texier C., Verhoef A., Stapel S.O., Akdis C.A., Maillere B., Kay A.B., Larché M. (2006). Induction of interleukin-10 and suppressor of cytokine signalling-3 gene expression following peptide immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 36(4): 465-474.
- Taylor A., Akdis M., Joss A., Akkoc T., Wenig R., Colonna M., Daigle I., Flory E., Blaser K., Akdis C.A. (2007). IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1. *J Allergy Clin Immunol*. 120: 76-83.
- Texier C., Pouvelle S., Busson M., Hervé M., Charron D., Ménez A., Maillère B. (2000). HLA-DR restricted peptide candidates for bee venom immunotherapy. *J Immunol*. 164: 3177-3184.
- Tighe H., Takabayashi K., Schwartz D., Van Nest G., Tuck S., Eiden J.J., Kagey-Sobotka A., Creticos P.S., Lichtenstein L.M., Spiegelberg H.L., Raz E. (2000). Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen Amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *J Allergy Clin Immunol*. 106: 124-134.
- Timmann C., Fuchs S., Thoma C., Lepping B., Brattig N.W., Sievertsen J., Thye T., Müller-Myhsok B., Horstmann R.D. (2004). Promoter haplotypes of the interleukin-10 gene influence proliferation of peripheral blood cells in response to helminth antigen. *Genes Immun*. 5: 256-260.
- Tosca M.A., Silvestri M., Morandi F., Prigione I., Pistorio A., Ciprandi G., Rossi G.A. (2011). Impairment of lung function might be related to IL-10 and IFN- γ defective production in allergic children. *Immunol Lett*. 140(1-2): 104-106.
- Twaroch T.E., Focke M., Civaj V., Weber M., Balic N., Mari A., Ferrara R., Quirce S., Spitzauer S., Swoboda I., Valenta R. (2011). Carrier-bound, nonallergenic Ole e 1 peptides for vaccination against olive pollen allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 128(1): 178-184.e7.
- Tyner J.W., Kim E.Y., Ide K., Pelletier M.R., Roswit W.T., Morton J.D., Battaile J.T., Patel A.C., Patterson G.A., Castro M., Spoor M.S., You Y., Brody S.L., Holtzman M.J. (2006). Blocking airway mucous cell metaplasia by inhibiting EGFR antiapoptosis and IL-13 transdifferentiation signals. *J Clin Invest*. 116(2): 309-321.

- Urrea J.M., Carrasco P., Feo-Brito F., De La Roca F., Guerra F., Cabrera C.M. (2014). Immunotherapy reduces CD40L expression and modifies cytokine production in the CD4 cells of pollen allergy patients. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 24(2): 98-105.
- Valovirta E., Jacobsen L., Ljorring C., Koivikko A., Savolainen J. (2006). Clinical efficacy and safety of sublingual immunotherapy with tree pollen extract in children. *Allergy.* 61: 1177-1183.
- Van Bever H.P., Stevens W.J. (1989). Suppression of the late asthmatic reaction by hyposensitization in asthmatic children allergic to house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy.* 19: 399-404.
- van der Neut-Kolfschoten M., Schuurman J., Losen M., Bleeker W.K., Martinez-Martinez P., Vermeulen E., den Bleker T.H., Wiegman L., Vink T., Aarden L.A., De Baets M.H., van de Winkel J.G., Aalberse R.C., Parren P.W. (2007). Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science.* 317: 1554-1557.
- Van Gasse A.L., Mangodt E.A., Faber M., Sabato V., Bridts C.H., Ebo D.G. (2015). Molecular allergy diagnosis: status anno 2015. *Clin Chim Acta.* pii: S0009-8981(15)00075-3. doi: 10.1016/j.cca.2015.02.012.
- Van Ree R., Van Leeuwen W.A., Dieges P.H., Van Wijk R.G., De Jong N., Brewczynski P.Z., Kroon A.M., Schilte P.P., Tan K.Y., Simon-Licht I.F., Roberts A.M., Stapel S.O., Aalberse R.C. (1997). Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy. *Clin Exp Allergy.* 27: 68-74.
- Vela C., Platas C., Gurbindo C., Tricas L., Subiza E., García R., Lahoz C. (1982). Fractionation and biological characterization of *Olea europea* pollen extract. *Int Arch Allergy Immunol.* 68: 289-294.
- Vieira P., de Waal-Malefyt R., Dang M.N., Johnson K.E., Kastelein R., Fiorentino D.F., deVries J.E., Roncarolo M.G., Mosmann T.R., Moore K.W. (1991). Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 1172-1176.
- Villalba M., Batanero E., López-Otín C., Sánchez L.M., Monsalve R.I., González de la Peña M.A., Lahoz C., Rodríguez R. (1993). The amino acid sequence of Ole e 1, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. *Eur J Biochem.* 216(3): 863-869.
- Villalba M., Rodríguez R., Batanero E. (2014). The spectrum of olive pollen allergens. From structures to diagnosis and treatment. *Methods.* 66(1): 44-54.
- Vourdas D., Syrigou E., Potamianou P., Carat F., Batard T., André C., Papageorgiou P.S. (1998). Double-blind, placebo-controlled evaluation of sublingual immunotherapy with standardized olive pollen extract in pediatric patients with allergic rhinoconjunctivitis and mild asthma due to olive pollen sensitization. *Allergy.* 53(7): 662-672.
- Vovolis V., Kalogiros L., Mitsias D., Sifnaios E. (2013). Severe repeated anaphylactic reactions to sublingual immunotherapy. *Allergol Immunopathol (Madr).* 41(4): 279-281.

- Wachholz P.A., Durham S.R. (2004). Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 4: 313-318.
- Wakefield L.M., Hill C.S. (2013). Beyond TGFbeta: roles of other TGFbeta superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer.*13: 328–341.
- Walker J.K.L., Penn R.B., Bond R.A. (2011). New perspectives regarding β 2 adrenoceptor ligands in the treatment of asthma. *Br J Pharmacol.* 163(1): 18-28.
- Wambre E., Bonvalet M., Bodo V.B., Maillère B., Leclert G., Moussu H., Von Hofe E., Louise A., Balazuc A.M., Ebo D., Hoarau C., Garcia G., Van Overtvelt L., Moingeon P. (2010). Distinct characteristics of seasonal (Bet v 1) vs. perennial (Der p 1/Der p 2) allergen-specific CD4-T cell responses. *Clin Exp Allergy.* 41(2): 192–203.
- Wan J., Luo Y., Yang C., Liu J., Du Y., Wang K. (2014). Expression of IL-35, Epstein-Barr virus-induced gene 3 mRNA and IL-12A mRNA in peripheral blood of patients with allergic rhinitis. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.* 28(13): 952-954. (Solo resumen).
- Wang C., Zhang L. (2014). Specific immunotherapy to allergic rhinitis in children. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 22(6): 487-494.
- Wheeler A.W. (1992). Hypersensitivity to the allergens of the pollen from the olive tree (*Olea europaea*). *Clin Exp Allergy.* 22(12): 1052-1057.
- Wheeler A.W., Hickman B.E., Fox B. (1990). Heterogeneity of a major allergen from olive (*Olea europaea*) pollen. *Mol Immunol.* 27: 631-636.
- Williams A.P., Krishna M.T., Frew A.J. (2004). The safety of immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 34: 513-514.
- Wilson D.R., Lima M.T., Durham S.R. (2005). Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis. *Allergy.* 60: 4-12.
- Wing K., Onishi Y., Prieto-Martin P., Yamaguchi T., Miyara M., Fehervari Z., Nomura T., Sakaguchi S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science.* 322: 271–275.
- Woodruff P.G., Boushey H.A., Dolganov G.M., Barker C.S., Yang Y.H., Donnelly S., Ellwanger A., Sidhu S.S., Dao-Pick T.P., Pantoja C., Erle D.J., Yamamoto K.R., Fahy J.V. (2007). Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(40): 15858-15863.
- Woodruff P.G., Modrek B., Choy D.F., Jia G., Abbas A.R., Ellwanger A., Koth L.L., Arron J.R., Fahy J.V. (2009). T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 180(5): 388-395.
- Xu Y.D., Cui J.M., Wang Y., Yin L.M., Gao C.K., Liu Y.Y., Yang Y.Q. (2010). The early asthmatic response is associated with glycolysis, calcium binding and mitochondria activity as revealed by proteomic analysis in rats. *Respir Res.* 11: 107.

- Yamamoto S., Yamamoto T., Tokunaga T. (2000). The Discovery of immunostimulatory DNA sequence. *Springer Semin Immunopathol.* 22(1-2): 11-19.
- Ye S., Wu J., Zhou L., Lv Z., Xie H., Zheng S. (2013). Interleukin-35: the future of hyperimmune-related diseases? *J Interferon Cytokine Res.* 33(6): 285-291.
- Zdanov A., Schalk-Hihi C., Wlodawer A. (1996). Crystal structure of human interleukin-10 at 1.6 Å resolution and a model of a complex with its soluble receptor. *Protein Sci.* 5: 1955–1962.
- Zhang Z., Chen Y., Tang J., Xie X. (2014). Frequent loss expression of dab2 and promotor hypermethylation in human cancers: a meta-analysis and systematic review. *Pak J Med Sci.* 30(2): 432-437.
- Zhao W., Guenard H. (1994). Bronchial smooth muscle energetics: effect of iodoacetate and hypoxia. *Respir Physiol.* 96: 285–296.
- Ziegler T., Rausch S., Steinfelder S., Klotz C., Hepworth M.R., Kühl A.A., Burda P.C., Lucius R., Hartmann S. (2015). A Novel Regulatory Macrophage Induced by a Helminth Molecule Instructs IL-10 in CD4+ T Cells and Protects against Mucosal Inflammation. *J Immunol.*
- Zimmer A., Bouley J., Le Mignon M., Pliquet E., Horiot S., Turfkruyer M., Baron-Bodo V., Horak F., Nony E., Louise A., Moussu H., Mascarell L., Moingeon P. (2012). A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 129(4): 1020-1030.

PÁGINAS WEB

- <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>.
- <http://string-db.org/>.
- <http://www.seaic.org/>.

ANEXO

ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS DOCTORAL

- Aguerri M., Calzada D., Martín E., Florido F., Quiralte J., Delgado J., Miranda A., López-Cacho J.M., Gallardo S., Lahoz C., Cárdbaba B. (2012). FOXP3 and TGF- β : Differential regulatory molecules between sensitization and tolerance to olive pollen. *Eur J of Inflamm.* 10(2): 193-202.
- Aguerri M., Calzada D., Montaner D., Mata M., Florido F., Dopazo J., Lahoz C., Cárdbaba B. (2013). Differential gene-expression analysis defines a molecular pattern related to olive pollen allergy. *J Biol Regul Homeost Agents.* 27(2): 337-350.
- Calzada D., Aguerri M., Baos S., Montaner D., Mata M., Dopazo J., Quiralte J., Florido F., Lahoz C., Cárdbaba B. (2015). Therapeutic targets for olive pollen allergy defined by gene markers modulated by Ole e 1-derived peptides. *Mol Immunol.* 64(2): 252-261.
- Calzada D., Aguerri M., Baos S., Lahoz C., Cárdbaba B. (2015) Epigenetic regulation analyses of FOXP3 in olive pollen allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol.* En prensa.

ARTÍCULOS Y TRABAJOS PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS DOCTORAL

- Cárdbaba B., Calzada D., Baos S., Aguerri M., Quiralte J., Lahoz C. (2014). Tumor necrosis factor-alpha, Transforming grown factor-beta and, Interleukin-10 polymorphisms in asthma associated to olive pollen sensitization. *Journal of Immunology Research.* Volume 2014, Article ID 276345, 7 pages.
- López-Cacho J.M., Gallardo S., Posada M., Aguerri M., Calzada D., Mayayo T., González-Rodríguez M.L., Rabasco A.M., Lahoz C., Cárdbaba B. Association of immunological cell profiles with specific clinical phenotypes of scleroderma disease. *BioMed Research International* (Formerly titled Journal of Biomedicine and Biotechnology) Vol 2014, Article ID 148293, 8 pages.
- Cárdbaba B., Aguerri M., Calzada D., Lahoz C. New challenges for old diseases: the impact of -OMICs Technologies in the understanding of Allergic Diseases. Allergic Diseases - Highlights in the Clinic, Mechanisms and Treatment, INTECH Open Access Publishers. Prof. C. Pereira (Ed.), 2012. pp 3-30. ISBN: 978-953-51-0227-4.

FOXP3 AND TGF- β : DIFFERENTIAL REGULATORY MOLECULES BETWEEN SENSITIZATION AND TOLERANCE TO OLIVE POLLEN

M. AGUERRI¹, D. CALZADA¹, E. MARTÍN^{1,2}, F. FLORIDO³, J. QUIRALTE⁴,
J. DELGADO⁵, A. MIRANDA⁶, J.M. LÓPEZ-CACHO¹, S. GALLARDO¹,
C. LAHOZ^{1,2} and B. CÁRDABA^{1,2}

¹Immunology Department, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain; ²CIBER de Enfermedades Respiratorias, CIBERES, Spain; ³Allergy Department, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain; ⁴Allergy Department, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain; ⁵Allergy Department, Policlínico, Sevilla, Spain; ⁶Allergy Department, Hospital Civil, Málaga, Spain

Received December 21, 2011 – Accepted March 16, 2012

Different molecular mechanisms may modulate sensitization and natural or induced tolerance to allergens. We have searched for differential mechanisms at humoral and cellular level in the olive pollen allergic response, checking the influence of exposure to allergens of subjects from an area with extremely high antigenic load during the pollen season. Sera and PBMCs were obtained during and outside the pollen season. Distinct Ig subtypes (total IgE and specific IgE, IgG4 and IgA), and Th1, Th2 and regulatory T cells (Treg) cytokines were analyzed in 5 groups of subjects: Group 1, non-allergic; Group 2, asymptomatic, sensitized to olive pollen; Group 3, allergic to pollen other than olive; Group 4, allergic to olive pollen (not treated); and Group 5, allergic to olive pollen, and getting specific immunotherapy. Asymptomatic subjects showed the highest total IgE levels. The major difference found between untreated and treated subjects was the high levels of non-inflammatory antibodies (IgG4) in treated patients. The main result of cytokine analyses was the statistically significant decrease in TGF- β levels in untreated olive pollen allergic subjects (pollen season) compared with treated. A significant decrease in forkhead winged-helix transcription factor (FOXP3) mRNA expression (marker of regulatory response) and a lower presence of Treg cells in PBMCs of olive pollen allergic subjects was found. The results point to a decrease in the cellular regulatory mechanisms mediated by TGF- β and FOXP3 in olive-pollen allergic patients that could be restored after specific-immunotherapy.

The reason why exposure to common environmental antigens induces allergic diseases in some people and not in others remains undetermined.

Allergen-specific CD4⁺ helper T-cell (Th) generation is the initial event leading to the development of allergic disease. Subtypes Th2

are pivotal to the inflammatory cascade through production of IL-4 (essential for the development of Th2 cells), IL-5 (for eosinophil recruitment), IL-13 (mediates isotype switching to IgE) and IL-9 (mucus hypersecretion). Th1 cells (secreting mainly IFN- γ) may contribute to the chronicity and effector phase

Key words: confocal microscopy, FOXP3, olive pollen allergic response, regulatory cells, TGF- β

Mailing address: Dr Blanca Cárdbaba,
Immunology Department,
IIS-Fundación Jiménez Díaz,
Avda Reyes Católicos N° 2,
28040 Madrid, Spain
Tel.: +34 1 5494445 Fax: +34 1 5448246
e-mail: bcardaba@fjd.es

DIFFERENTIAL GENE-EXPRESSION ANALYSIS DEFINES A MOLECULAR PATTERN RELATED TO OLIVE POLLEN ALLERGY

M. AGUERRI¹, D. CALZADA¹, D. MONTANER², M. MATA^{3,4}, F. FLORIDO⁵, J. QUIRALTE⁶, J. DOPAZO², C. LAHOZ^{1,4} and B. CÁRDABA^{1,4}

¹Immunology Department, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain; ²Functional Genomic Unit Bioinformatics Department. Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia, Spain; ³Genomic Department, Fundación de Investigación, Hospital General Universitario, Valencia, Spain; ⁴CIBER de Enfermedades Respiratorias, CIBERES, Spain; ⁵Allergy Department, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain; ⁶Allergy Department, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

Received October 2, 2012 – Accepted February 8, 2013

The first two authors have contributed equally to this work.

Analysis of gene-expression profiles by microarrays is useful for characterization of candidate genes, key regulatory networks, and to define phenotypes or molecular signatures which improve the diagnosis and/or classification of the allergic processes. We have used this approach in the study of olive pollen response in order to find differential molecular markers among responders and non-responders to this allergenic source. Five clinical groups, non-allergic, asymptomatic, allergic but not to olive pollen, untreated-olive-pollen allergic patients and olive-pollen allergic patients (under specific-immunotherapy), were assessed during and outside pollen seasons. Whole-genome gene expression analysis was performed in RNAs extracted from PBMCs. After assessment of data quality and principal components analysis (PCA), differential gene-expression, by multiple testing and, functional analyses by KEGG, for pathways and Gene-Ontology for biological processes were performed. Relevance was defined by fold change and corrected *P* values (<0.05). The most differential genes were validated by qRT-PCR in a larger set of individuals. Interestingly, gene-expression profiling obtained by PCA clearly showed five clusters of samples that correlated with the five clinical groups. Furthermore, differential gene expression and functional analyses revealed differential genes and pathways in the five clinical groups. The 93 most significant genes found were validated, and one set of 35 genes was able to discriminate profiles of olive pollen response. Our results, in addition to providing new information on allergic response, define a possible molecular signature for olive pollen allergy which could be useful for the diagnosis and treatment of this and other sensitizations.

Allergic diseases are highly complex adverse reactions of the immune system against otherwise harmless substances. The reason why exposure to common environmental antigens induces allergic

Key words: microarray, gene expression, Gene set enrichment, genomic and allergy, molecular signature, olive pollen sensitization

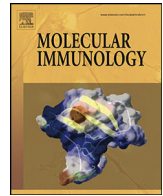
Mailing address: Blanca Cárdbaba,
Immunology Department,
IIS- Fundación Jiménez Díaz,
Avda Reyes Católicos, 2,
28040 Madrid Spain
Tel.: +34 1 5494445 Fax: +34 1 5448246
e-mail: bcardaba@fjd.es

0393-974X (2013)

Copyright © by BIOLIFE, s.a.s.

This publication and/or article is for individual use only and may not be further reproduced without written permission from the copyright holder.

Unauthorized reproduction may result in financial and other penalties
DISCLOSURE: ALL AUTHORS REPORT NO CONFLICTS OF INTEREST RELEVANT TO THIS ARTICLE.



Therapeutic targets for olive pollen allergy defined by gene markers modulated by Ole e 1-derived peptides

David Calzada^{a,1}, Miriam Aguerri^{a,1}, Selene Baos^a, David Montaner^c, Manuel Mata^{d,b}, Joaquín Dopazo^c, Joaquín Quiralte^e, Fernando Florido^f, Carlos Lahoz^{a,b}, Blanca Cárdbaba^{a,b,*}

^a Immunology Department, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, Spain

^b CIBERES, CIBER de Enfermedades Respiratorias, Madrid, Spain

^c Functional Genomics Unit Bioinformatics Department, Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia, Spain

^d Genomics Department, Fundación de Investigación, Hospital General Universitario, Valencia, Spain

^e Allergy Department, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

^f Allergy Department, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 November 2014

Received in revised form 1 December 2014

Accepted 8 December 2014

Available online 29 December 2014

Keywords:

Gene-expression and allergy

Immunoregulatory response

Olive-pollen allergy

Peptide immunotherapy

Therapeutic gene targets

ABSTRACT

Two regions of Ole e 1, the major olive-pollen allergen, have been characterized as T-cell epitopes, one as immunodominant region (aa91–130) and the other, as mainly recognized by non-allergic subjects (aa10–31). This report tries to characterize the specific relevance of these epitopes in the allergic response to olive pollen by analyzing the secreted cytokines and the gene expression profiles induced after specific stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). PBMCs from olive pollen-allergic and non-allergic control subjects were stimulated with olive-pollen extract and Ole e 1 dodecapeptides containing relevant T-cell epitopes. Levels of cytokines were measured in cellular supernatants and gene expression was determined by microarrays, on the RNAs extracted from PBMCs. One hundred eighty-nine differential genes (fold change >2 or <−2, $P < 0.05$) were validated by qRT-PCR in a large population.

It was not possible to define a pattern of response according the overall cytokine results but interesting differences were observed, mainly in the regulatory cytokines. Principal component (PCA) gene-expression analysis defined clusters that correlated with the experimental conditions in the group of allergic subjects. Gene expression and functional analyses revealed differential genes and pathways among the experimental conditions. A set of 51 genes (many essential to T-cell tolerance and homeostasis) correlated with the response to aa10–31 of Ole e 1. In conclusion, two peptides derived from Ole e 1 could regulate the immune response in allergic patients, by gene-expression modification of several regulation-related genes. These results open new research ways to the regulation of allergy by *Oleaceae* family members.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Allergen-specific CD4⁺ helper T-cell (Th) generation is the initial event leading to the development of allergic disease. Type I allergy

Abbreviations: PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; PCA, principal component analysis; Tregs, regulatory T-cells; EAACI, European Academy of Allergology and Clinical Immunology; GO, gene ontology; KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

* Corresponding author at: Immunology Department, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Avda Reyes Católicos No. 2, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 5494445; fax: +34 91 5448246.

E-mail address: bcardaba@fjd.es (B. Cárdbaba).

¹ These authors have contributed equally to this article.

is caused by an inappropriate Th2 response to environmental allergens (El Biase et al., 2003; Schleimer et al., 1989; Walker et al., 1991) leading to antigen-specific IgE production as well as recruitment and activation of proinflammatory cells (e.g., eosinophils and mast cells) in mucosal target organs (Hakansson et al., 1997, 1998; Till et al., 1997). In contrast, under similar exposure conditions, tolerance to allergens is maintained in non-allergic individuals. A deficit in immune tolerance is considered to cause allergy in pre-disposed individuals. Peripheral T-cell tolerance is characterized by functional inactivation due to specific T-cell subtypes with an immunosuppressive function, generically named regulatory T-cells (Tregs) (Akdis, 2008). IL-10 and TGF- β , secreted by these Tregs, may play an important role (Robinson, 2009; Akdis and Akdis, 2009; Palomares et al., 2010).

TITLE: EPIGENETIC REGULATION ANALYSES OF FOXP3 IN OLIVE POLLEN ALLERGY

AUTHORS: David Calzada^{1*}, BSc, Miriam Aguerri^{1*}, PhD, Selene Baos^{1,2}, BSc, Carlos Lahoz^{1,2}, MD, PhD, Blanca Cardaba^{1,2}, PhD.

INSTITUTIONS:

¹**Immunology Department, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, Spain.**

²**CIBERES, CIBER de Enfermedades Respiratorias, Spain.**

*** D. Calzada and M. Aguerri have contributed equally to this article.**

CORRESPONDENCE: Blanca Cárdaba
Immunology Department,
Fundación Jiménez Díaz
Avda Reyes Católicos No 2
28040 Madrid
Spain

TELEPHONE/FAX: +34-1-5494445/ +34-1-5448246

e-mail address: : bcardaba@fjd.es

KEY WORDS: Epigenetic, FOXP3, immunoregulation, methylation, olive pollen allergy.

PALABRAS CLAVE: Epigenetica, FOXP3, Inmuno-regulación, metilación, alergia al polen de olivo.

TITLE: EPIGENETIC REGULATION ANALYSES OF FOXP3 IN OLIVE POLLEN ALLERGY

Regulatory T cells (Treg) are essential for the induction and maintenance of immune tolerance to allergens [1]. Forkhead winged-helix transcriptional factor (FOXP3) has been identified as a specific molecular marker for Treg cells, and its expression is considered essential for the formation and function of Treg. Its absence is associated with severe allergic inflammation and high IgE levels [2]. There are many molecular mechanisms described that could modulate its expression [3]. Several groups have observed that epigenetic regulation is crucial for controlling the expression of FOXP3 locus [4-6].

In 2007, an evolutionary conserved CpG-rich element within the *Foxp3* locus was identified as selectively demethylated in nTreg, but not in FOXP3⁻CD4⁺CD25⁻ or conventional T cells. This Treg-specific demethylated region (TSDR) was also associated with modified histones in nTreg, but not in FOXP3⁻ T cells, strengthening the idea that epigenetic mechanisms contribute to the control of FOXP3 gene expression. Demethylation of TSDR corresponds with the stability of FOXP3 expression [7]. Currently, several studies have demonstrated that the methylation status of FOXP3 is implicated in several diseases such as systemic sclerosis [8]. Specifically, in allergies this mechanism likes to contribute to clinical immune tolerance during peanut oral immunotherapy [9].

Olive pollen allergy is one of the major causes of allergic diseases in Mediterranean countries and some regions of Australia and North America. Olive pollen induces mainly nasal and conjunctive symptoms, although it may induce asthma exacerbations in areas with high airborne levels of pollen.

Recently we have demonstrated that PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) from olive pollen allergic patients showed a decrease of a regulatory cytokine, TGF- β , and this decrease, correlated with low levels of FOXP3 expression compared with non-allergic controls [10]. These findings led us to study the DNA methylation of FOXP3, as a possible mechanism responsible for the differences found in FOXP3 expression between untreated olive pollen allergic subjects and healthy controls, specifically, in a region called TSDR that was suggested as an important methylation-sensitive element regulating FOXP3 expression [11].

The population studied was composed by 39 subjects, 22 non-allergic subjects and 17 untreated olive-pollen-allergic patients, selected from a previous immunological study [10] and recruited at the Allergy Service of hospitals in Andalusia (a region in Spain with particularly high pollen counts during the pollen season).

Olive pollen-allergic patients fulfilled the following inclusion criteria: seasonal rhinitis and/or asthma from April to June, positive skin prick test of *O. europaea* pollen extract (ALK Abelló, Madrid, Spain) and no previous immunotherapy.

The exclusion criteria were: current smoking, less than 10 years' residence in the selected area (Andalusia, a region in Spain with particularly high pollen counts during the pollen season, 5000 grains/m³, with peaks reaching more than 10000 grains/m³).

Informed consent was obtained from each subject. Ethical approval for the study was obtained from the Ethical and Research Committee of each participating hospitals. Biological samples were obtained from Biobanco-FJD, IIS-Fundación Jiménez Díaz Madrid.

Total IgE and *O.europaea* specific IgE antibodies were higher in allergic patients ($166,76 \pm 160,67$; $21,47 \pm 19,61$, respectively) compared to those in the control group ($71,03 \pm 91,60$; $0,34 \pm 0,00$), being statistically significant ($p < 0.05$).

The mean levels of FOXP3 gene expression determined by qRT-PCR, was statistically decreased in untreated olive pollen allergic subjects compared with control group, as was previously described [10].

For DNA methylation study of TSDR (320 bp, X-chromosome 49117047-49117367, positive strand) (genome.ucsc.edu), we designed a methylation specific PCR, that allowed the study of 14 CpGs islands. Amplification primers were based on the previously described [5] but with modifications, using the Pyromark Assay Design Software 2.0 (Qiagen). Schematic view of the study design is shown in Figure 1A. Specifically, genomic DNA was isolated from untreated allergic patients (n=22) and controls' whole blood samples (n=17) (extracted during the olive pollen season) using BioRobot EZ1 DSP Workstation (Qiagen, Valencia, CA, USA) and bisulfite conversion of these genomic DNA was performed using MethylCode Bisulfite Conversion (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). PCR was performed in a final volume of 50 μ l containing 1xPCR Buffer (Promega, Madison, USA), 1.25 U Go Taq DNA polymerase (Promega, Madison, USA), 200 μ M dNTPs, 1.5 μ M MgCl₂, 12.5 pmol of each primer (forward and reverse), and 15 ng bisulfited-treated genomic DNA. As negative controls DNA without bisulfite conversion and PCR reactives without DNA were used. PCR consisted of an initial denaturation step of 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min and a final step of 72°C for 10 min. PCR products were analyzed on 2.5% agarose gels, stained with ethidium bromide. The primers designed led us to the correct specific PCR amplification of the bisulfite-treated DNA of the TSDR region (320bp) (Fig. 1B). After amplification, CpGs methylation status was analyzed by pyrosequencing technology, using 3 sequencing primers (Fig. 1A) designed by Pyromark Assay Design, Software 2.0. The methylation index for each sample was calculated as the mean value of percentage for all examined

CpGs islands. Fig. 1C shows the methylation status profile of the 14 CpGs islands that were studied. There was not a clear pattern of FOXP3 methylation profile between the two groups of study. Both groups have heavily methylated islands in the TSDR region, however methylation status of one CpG (number 10) was statistically increased in controls compared to allergic patients. This result was unexpected because we suspected that the down-expression of FOXP3 in allergic patients would be associated with a greater hypermethylation status in relation with healthy controls. Hypomethylation status of the TSDR region usually is associated with a stable FOXP3 expression, although several authors reported that demethylation of the TSDR corresponds with stability of FOXP3 expression (as in natural Treg cells), whereas T cells that express FOXP3 only transiently (TGF- β -induced Treg cells and recently activated conventional human T cells) have a methylated TSDR [4]. One of the major facts for the lack of differences find could be due that the DNA analyzed was extracted from peripheral blood samples and not from DNA purified of Treg or T-cells. This experimental design was performed for using the same experimental approach that previously, in order to correlate methylation degree with our previous gene-expression [10] but the data reflect that it is not the optimal strategy for FOXP3 methylation study.

In conclusion, our data show that the analysis of methylation degree of TSDR-FOXP3 region using DNA extracted from peripheral blood is unable to explain the decrease of FOXP3 described in olive pollen allergic subjects, although does not exclude the methylation implication in FOXP3 stability.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from the Fondo de Investigación Sanitaria (Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain) with PI10/0025, PI13/01730, CIBERES (ISCIII, 0013) and RETIC (RD09/0076/00101) and from Fundación Conchita Rábago for fellows to D. Calzada and S. Baos.

Conflict of interest

The authors declare that there is not conflict of interest regarding the publication of this paper.

REFERENCES

1. Palomares O, Yaman G, Azkur AK, Akkoc T, Akdis M, Akdis CA. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol.* 2010; 40 (5): 1232-40.
2. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003; 4: 337-42.
3. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med.* 2005; 201(7): 1061-67.
4. Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage?. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9(2): 83-9.
5. Baron U, Floess S, Wiczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, Thiel A, Boeld TJ, Hoffmann P, Edinger M, Türbachova I, Hamann A, Olek S, Huehn J. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells. *Eur J Immunol.* 2007; 37(9): 2378-89.
6. Lal G, Zhang N, van der Touw W, Ding Y, Ju W, Bottinger EP, Reid SP, Levy DE, Bromberg JS. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *J Immunol.* 2009; 182(1): 259-73.
7. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, Schlawe K, Chang HD, Bopp T, Schmitt E, Klein-Hessling S, Serfling E, Hamann A, Huehn J. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* 2007; 5(2): e38.
8. Wang YY, Wang Q, Sun XH, Liu RZ, Shu Y, Kanekura T, Huang JH, Li YP, Wang JC, Zhao M, Lu QJ, Xiao R. DNA hypermethylation of the Forkhead box protein 3 (FOXP3) promoter in CD4+T cells of patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol.* 2014; DOI: 10.1111/bjd.12913.

9. Syed A, García MA, Lyu SC , Bucayu R, Kohli A, Ishida S, Berglund JP, Tsai M, Maecker H, O'Riordan G, Galli SJ, Nadeau KC. Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T-cell function and hypomethylation of forkhead box protein 3 (FOXP3). *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 133(2):500-10.
10. Aguerri M, Calzada D, Martín E, Florido F, Quiralte J, Delgado J, Miranda A, López-Cacho JM, Gallardo S, Lahoz C, Cárdbaba B. FOXP3 and TGF- β : Differential regulatory molecules between sensitization and tolerance to olive pollen. *Eur J Inflammation*. 2012; 10(2): 193-202.
11. Liu J, Lluís A, Illi S, Layland L, Olek S, von Mutius E, Schaub B. T regulatory cells in cord blood-FOXP3 demethylation as reliable quantitative marker. *PLoS One*. 2010; 5(10);e13267.

LEGENDS TO FIGURE

Figure 1. **A)** Schematic overview of the TSDR region and the amplicon designed for methylation analysis. Upper arrows show forward and biotinylated reverse primers. Lower arrows represents sequencing primers. **B)** Agarose gel analysis of PCR products: 1. PCR products obtained from Bisulfite-treated genomic DNA. Negative controls: 2. Not Bisulfite-treated genomic DNA, 3. PCR Control (without DNA). 4. 100 bp DNA ladder (Promega Madison, USA). **C)** Methylation profiles of olive pollen allergic patients and healthy controls. Panel shows mean percentage of methylation for each CpG island of the two groups of study. Asterisk remarks statistically significant differences.

Regulatory T cells (Treg) are essential for the induction and maintenance of immune tolerance to allergens [1]. Forkhead winged-helix transcriptional factor (FOXP3) has been identified as a specific molecular marker for Treg cells, and its expression is considered essential for the formation and function of Treg. Its absence is associated with severe allergic inflammation and high IgE levels [2]. There are many molecular mechanisms described that could modulate its expression [3]. Several groups have observed that epigenetic regulation is crucial for controlling the expression of FOXP3 locus [4-5].

In 2007, an evolutionary conserved CpG-rich element within the *Foxp3* locus was identified as selectively demethylated in nTreg, but not in FOXP3⁻CD4⁺CD25⁻ or conventional T cells. This Treg-specific demethylated region (TSDR) was also associated with modified histones in nTreg, but not in FOXP3⁻ T cells, strengthening the idea that epigenetic mechanisms contribute to the control of FOXP3 gene expression. Demethylation of TSDR corresponds with the stability of FOXP3 expression [6]. Currently, several studies have demonstrated that the methylation status of FOXP3 is implicated in several diseases such as systemic sclerosis [7]. Specifically, in allergies this mechanism likes to contribute to clinical immune tolerance during peanut oral immunotherapy [8].

Olive pollen allergy is one of the major causes of allergic diseases in Mediterranean countries and some regions of Australia and North America. Olive pollen induces mainly nasal and conjunctive symptoms, although it may induce asthma exacerbations in areas with high airborne levels of pollen.

Recently we have demonstrated that PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) from olive pollen allergic patients showed a decrease of a regulatory cytokine, TGF- β , and this decrease, correlated with low levels of FOXP3 expression compared

with non-allergic controls [9]. These findings led us to study the DNA methylation of FOXP3, as a possible mechanism responsible for the differences found in FOXP3 expression between untreated olive pollen allergic subjects and healthy controls, specifically, in a region called TSDR that was suggested as an important methylation-sensitive element regulating FOXP3 expression [10].

The population studied was composed by 39 subjects, 22 non-allergic subjects and 17 untreated olive-pollen-allergic patients, selected from a previous immunological study [9] and recruited at the Allergy Service of hospitals in Andalusia (a region in Spain with particularly high pollen counts during the pollen season).

Olive pollen-allergic patients fulfilled the following inclusion criteria: seasonal rhinitis and/or asthma from April to June, positive skin prick test of *O. europaea* pollen extract (ALK Abelló, Madrid, Spain) and no previous immunotherapy.

The exclusion criteria were: current smoking, less than 10 years' residence in the selected area (Andalusia, a region in Spain with particularly high pollen counts during the pollen season, 5000 grains/m³, with peaks reaching more than 10000 grains/m³).

Informed consent was obtained from each subject. Ethical approval for the study was obtained from the Ethical and Research Committee of each participating hospitals. Biological samples were obtained from Biobanco-FJD, IIS-Fundación Jiménez Díaz Madrid.

Total IgE and *O.europaea* specific IgE antibodies were higher in allergic patients ($166,76 \pm 160,67$; $21,47 \pm 19,61$, respectively) compared to those in the control group ($71,03 \pm 91,60$; $0,34 \pm 0,00$), being statistically significant ($p < 0.05$).

The mean levels of FOXP3 gene expression determined by qRT-PCR, was statistically decreased in untreated olive pollen allergic subjects compared with control group, as was previously described [9].

For DNA methylation study of TSDR (320 bp, X-chromosome 49117047-49117367, positive strand) (genome.ucsc.edu), we designed a methylation specific PCR, that allowed the study of 14 CpGs islands. Amplification primers were based on the previously described [5] but with modifications, using the Pyromark Assay Design Software 2.0 (Qiagen). Schematic view of the study design is shown in Figure 1A. Specifically, genomic DNA was isolated from untreated allergic patients (n=22) and controls' whole blood samples (n=17) (extracted during the olive pollen season) using BioRobot EZ1 DSP Workstation (Qiagen, Valencia, CA, USA) and bisulfite conversion of these genomic DNA was performed using MethylCode Bisulfite Conversion (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). PCR was performed in a final volume of 50 μ l containing 1xPCR Buffer (Promega, Madison, USA), 1.25 U Go Taq DNA polymerase (Promega, Madison, USA), 200 μ M dNTPs, 1.5 μ M MgCl₂, 12.5 pmol of each primer (forward and reverse), and 15 ng bisulfited-treated genomic DNA. As negative controls DNA without bisulfite conversion and PCR reactives without DNA were used. PCR consisted of an initial denaturation step of 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min and a final step of 72°C for 10 min. PCR products were analyzed on 2.5% agarose gels, stained with ethidium bromide. The primers designed led us to the correct specific PCR amplification of the bisulfite-treated DNA of the TSDR region (320bp) (Fig. 1B). After amplification, CpGs methylation status was analyzed by pyrosequencing technology, using 3 sequencing primers (Fig. 1A) designed by Pyromark Assay Design, Software 2.0. The methylation index for each sample was calculated as the mean value of percentage for all examined CpGs islands. Fig. 1C shows the methylation status profile of the 14 CpGs islands that were studied. There was not a clear pattern of FOXP3 methylation profile between the two groups of study. Both groups have heavily methylated islands in the TSDR region,

however methylation status of one CpG (number 10) was statistically increased in controls compared to allergic patients. This result was unexpected because we suspected that the down-expression of FOXP3 in allergic patients would be associated with a greater hypermethylation status in relation with healthy controls. Hypomethylation status of the TSDR region usually is associated with a stable FOXP3 expression, although several authors reported that demethylation of the TSDR corresponds with stability of FOXP3 expression (as in natural Treg cells), whereas T cells that express FOXP3 only transiently (TGF- β -induced Treg cells and recently activated conventional human T cells) have a methylated TSDR [4]. One of the major facts for the lack of differences found could be due that the DNA analyzed was extracted from peripheral blood samples and not from DNA purified of Treg or T-cells. This experimental design was performed for using the same experimental approach that previously, in order to correlate methylation degree with our previous gene-expression [9] but the data reflect that it is not the optimal strategy for FOXP3 methylation study.

In conclusion, our data show that the analysis of methylation degree of TSDR-FOXP3 region using DNA extracted from peripheral blood is unable to explain the decrease of FOXP3 described in olive pollen allergic subjects, although does not exclude the methylation implication in FOXP3 stability.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from the Fondo de Investigación Sanitaria (Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain) with PI10/0025, PI13/01730, CIBERES (ISCIII, 0013) and RETIC (RD09/0076/00101) and from Fundación Conchita Rábago for fellows to D. Calzada and S. Baos.

Conflict of interest

The authors declare that there is not conflict of interest regarding the publication of this paper.

REFERENCES

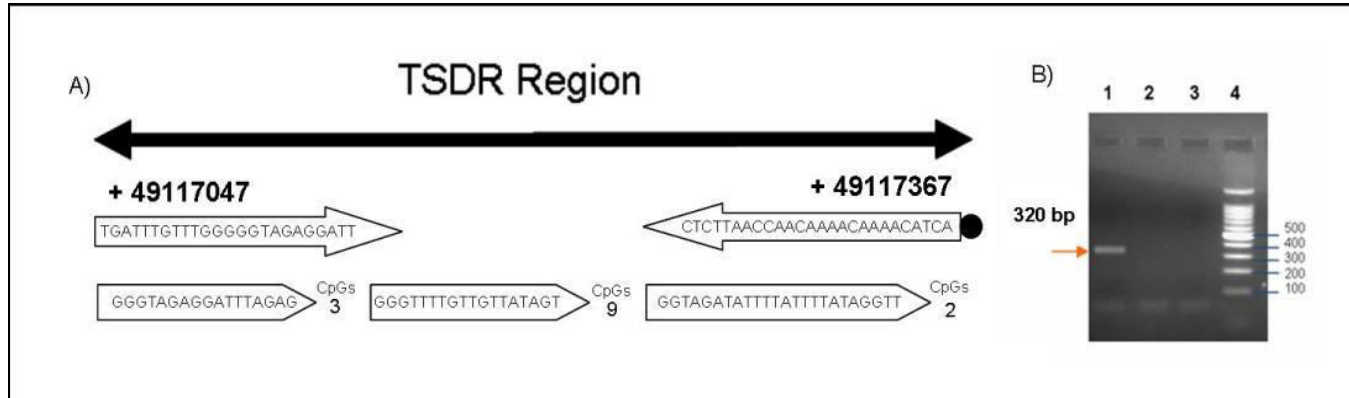
1. Palomares O, Yaman G, Azkur AK, Akkoc T, Akdis M, Akdis CA. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol.* 2010; 40 (5): 1232-40.
2. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003; 4: 337-42.
3. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med.* 2005; 201(7): 1061-67.
4. Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage?. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9(2): 83-9.
5. Baron U, Floess S, Wiczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, Thiel A, Boeld TJ, Hoffmann P, Edinger M, Türbachova I, Hamann A, Olek S, Huehn J. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells. *Eur J Immunol.* 2007; 37(9): 2378-89.
6. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, Schlawe K, Chang HD, Bopp T, Schmitt E, Klein-Hessling S, Serfling E, Hamann A, Huehn J. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* 2007; 5(2): e38.
7. Wang YY, Wang Q, Sun XH, Liu RZ, Shu Y, Kanekura T, Huang JH, Li YP, Wang JC, Zhao M, Lu QJ, Xiao R. DNA hypermethylation of the Forkhead box protein 3 (FOXP3) promoter in CD4+T cells of patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol.* 2014; DOI: 10.1111/bjd.12913.
8. Syed A, García MA, Lyu SC, Bucayu R, Kohli A, Ishida S, Berglund JP, Tsai M, Maecker H, O'Riordan G, Galli SJ, Nadeau KC. Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T-cell function and hypomethylation of forkhead box protein 3 (FOXP3). *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 133(2):500-10.

9. Aguerri M, Calzada D, Martín E, Florido F, Quiralte J, Delgado J, Miranda A, López-Cacho JM, Gallardo S, Lahoz C, Cárdbaba B. FOXP3 and TGF- β : Differential regulatory molecules between sensitization and tolerance to olive pollen. *Eur J Inflammation*. 2012; 10(2): 193-202.
10. Liu J, Lluís A, Illi S, Layland L, Olek S, von Mutius E, Schaub B. T regulatory cells in cord blood-FOXP3 demethylation as reliable quantitative marker. *PLoS One*. 2010; 5(10):e13267.

LEGENDS TO FIGURE

Figure 1. **A)** Schematic overview of the TSDR region and the amplicon designed for methylation analysis. Upper arrows show forward and biotinylated reverse primers. Lower arrows represents sequencing primers. **B)** Agarose gel analysis of PCR products: 1. PCR products obtained from Bisulfite-treated genomic DNA. Negative controls: 2. Not Bisulfite-treated genomic DNA, 3. PCR Control (without DNA). 4. 100 bp DNA ladder (Promega Madison, USA). **C)** Methylation profiles of olive pollen allergic patients and healthy controls. Panel shows mean percentage of methylation for each CpG island of the two groups of study. Asterisk remarks statistically significant differences.

Figure 1.



c)

