

IgE SÉRICA E IgA SALIVAL, TOTAL Y ESPECÍFICA PARA *DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS* Y SUBPOBLACIONES LEUCOCITARIAS EN NIÑOS ATÓPICOS Y NO ATÓPICOS CON ASMA Y/O RINITIS

Total and *Dermatophagoides pteronyssinus* specific IgE and salivary IgA and leukocyte populations in atopic and non-atopic children with asthma and/or rhinitis

Horacio Marcelo Serra¹, Stefania Santo², María Inés Pereira², Pablo Romero³, Adriana Cassinerio³, Telma Varela⁴, Omar Romero³, Julio César Orellana⁴.

RESUMEN

Objetivo. Investigar inmunológicamente niños con problemas respiratorios de asma y/o rinitis (atópicos o no atópicos) en la búsqueda de evidencias que permitan una mejor comprensión del desbalance que padecen estos niños en su sistema inmune. **Materiales y métodos.** Se estudiaron 47 niños de ambos sexos, con edades comprendidas entre los 6 y 15 años, que concurren a la consulta por afecciones respiratorias compatibles con asma y/o rinitis a la División de Alergia e Inmunología del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de la Ciudad de Córdoba. Según la información obtenida en la anamnesis, examen físico y prick tests, fueron divididos en dos grupos: atópicos (n=25) y no atópicos (n=22). Luego que los padres firmaron el consentimiento informado y los niños mayores a 7 años dieron su asentimiento para participar del trabajo de investigación, se tomaron muestras de sangre y saliva, para determinar concentración y actividad específica en inmunoglobulinas (Igs) así como estudiar poblaciones leucocitarias y subpoblaciones linfocitarias. **Resultados.** Como era previsible, los niveles de IgE sérica total y los porcentajes relativos de eosinófilos sanguíneos se mostraron significativamente elevados en el grupo de los niños atópicos (A) con respecto a los no atópicos (NA). El estudio de IgE sérica específica para *Dermatophagoides pteronyssinus* solo arrojó resultados positivos en los pacientes A y se observó una correlación significativa entre los niveles de IgE total y específica para dicho alérgeno, y entre los niveles de prick y RAST. Los niveles séricos de IgG e IgA no demostraron diferencias de significación entre ambos grupos. El estudio de la IgA salival (IgAs) total permitió observar en el grupo de los niños NA concentraciones significativamente mayores que las correspondientes al grupo de pacientes A. Sin embargo, al estudiar la IgAs específica para el *D. pteronyssinus*, se observó lo inverso: los pacientes A tienen casi el doble de IgAs específica para el alérgeno respecto del grupo NA. En el estudio de subpoblaciones de células T (CD3, CD4 y CD8), no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. Las subpoblaciones de linfocitos B CD27- y linfocitos B CD27+ tuvieron valores similares en ambos grupos (aproximadamente 80% y 20%, respectivamente). En ambos grupos, alrededor de un 50% de los linfocitos B CD27+ expresaron IgD y el 50% restante fueron IgD-. Sin embargo, el grupo de niños A tuvo dos veces menos de linfocitos B que expresan alta densidad de la molécula CD27 (CD27+++ con respecto a los niños NA (p=0,044). **Conclusión.** Entre los parámetros inmunológicos investigados encontramos diferencias significativas entre niños A y NA en las concentraciones totales y específicas para el *D. pteronyssinus* en los isotipos de IgE e IgAs, y en una subpoblación de linfocitos B CD27+++ . Dichos hallazgos son analizados en la discusión del manuscrito.

Palabras claves: hipersensibilidad, atopia, asma, rinitis, IgE, IgA salival, linfocitos B.

ABSTRACT

Purpose. To perform an immunological investigation in children with respiratory problems of asthma and/or rhinitis (atopic or non atopic) in order to get a better understanding of the immune system imbalance in these patients. **Materials and methods.** 47 children of both sexes, aged between 6 and 15 years, who were attended for respiratory diseases at the Division of Allergy and Immunology at Children's Hospital de la Santísima Trinidad from Córdoba city were studied. According to information obtained on clinical history, physical examination and prick tests they were divided into two groups: Atopics (n=25) and non-atopic (n=22). After parents signed informed consent and children over 7 years assent to participate in the research work, samples of blood and saliva were taken to determine immune globulins concentrations and specific activities as well as to study leukocyte populations and lymphocytes subpopulations. **Results.** As expected, levels of total serum IgE and the relative percentages of blood eosinophils were significantly higher in the group of atopic (A) children with regard to non-atopic (NA) children. The study of specific serum IgE for *Dermatophagoides pteronyssinus* only showed positive results in the A group, and positive correlations between the levels of total and specific IgE, as well as prick and RAST values. Serum IgG and IgA levels showed no significant differences between both groups. Total salivary IgA concentrations were significantly higher in the group of NA children than in the group of A patients. Surprisingly, when specific salivary IgA for *D. pteronyssinus* was studied, the opposite was observed: Atopic patients have nearly twice specific salivary IgA for this allergen than the NA children. In the study of T cells subpopulations (CD3, CD4 and CD8), no significant differences between groups were observed. The subpopulations of CD27-B cells and CD27+ B cells were similar in both groups (roughly 80% and 20%, respectively). In both groups, approximately 50% of CD27+ B cells expressed IgD and the remaining 50% were IgD-. However, atopic children had less than half B cells expressing high density of CD27 molecule (CD27+++ with respect to the NA children (p=0.044). **Conclusion:** Among the immunological parameters investigated, we found significant differences between A and NA children in the concentrations of total and specific IgE and salivary IgA to the allergen, and in a subpopulation of CD27+++ B cells. These findings are debated in the discussion of the manuscript.

Key words: hypersensitivity, atopy, asthma, rhinitis, IgE, salivary IgA, B lymphocytes.

ARCHIVOS DE ALERGI A E INMUNOLOGÍA CLÍNICA 2015;46(3):95-105

1. CIBICI, Facultad Ciencias Químicas, UNC.
2. Laboratorio de Inmunología, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad.
3. Laboratorio Privado de Inmunología.
4. División de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Córdoba.

Premio AAAeIC al mejor trabajo en Investigación Clínica en Alergia. XXXVIII Congreso de Alergia e Inmunología Clínica. Asociación Argentina de Alergia e Inmunología Clínica

Correspondencia: hserra@bioclin.fcq.unc.edu.ar

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

Recibido: 07/2015 | Aceptado: 08/2015

INTRODUCCIÓN

El término *rinitis* se utiliza para describir a un grupo heterogéneo de trastornos nasales caracterizado por uno o más de los siguientes síntomas clínicos: congestión nasal, rinorrea, prurito nasal y estornudos. El asma es una condición clínica compleja y heterogénea, en donde participan múltiples factores genéticos y ambientales, que conducen a la tríada patológica de obstrucción intermitente y reversible de las vías respiratorias, inflamación bronquial crónica con infiltrado leucocitario e hipertrofia de las células del músculo liso bronquial e hiperreactividad a los broncoconstrictores¹⁻⁴.

Estudios previos realizados en el mundo desarrollado han demostrado fehacientemente un claro aumento de las tasas de incidencia del asma durante la segunda mitad del siglo XX^{5,6}. En todos los casos el aumento de asma y sensibilización alérgica se correlacionó con mejoras en las condiciones de vida (prosperidad) de los grupos poblacionales estudiados. Otras investigaciones han aportado nuevas evidencias de que probablemente el aumento de los pacientes con asma se debe a uno o más cambios ambientales operando en un subconjunto genéticamente predispuesto de la población^{7,8}.

En el año 2001, la revista *Allergy* publicó un *position paper* sobre nomenclatura alérgica, trabajo que fue encargado por la *European Academy of Allergology and Clinical Immunology* a un grupo de profesionales especialistas en esta disciplina médica⁹. En dicho documento se define el término *hipersensibilidad* como un conjunto de síntomas y signos reproducibles, iniciados por la exposición a un estímulo definido y a una dosis tolerada en individuos normales. El término *alergia* se define como una reacción de hipersensibilidad iniciada por mecanismos inmunológicos, y el término *atopia* como una reacción de hipersensibilidad alérgica en donde participan mecanismos inmunológicos tales como linfocitos Th2 productores de IL-4, IgE específicas para alérgenos, células cebadas, eosinófilos y productos liberados por dichas células. Basándonos en esta terminología utilizaremos de ahora en adelante términos como asma/rinitis atópicas y asma/rinitis no atópicas. Los conocimientos sobre patogenia y fisiopatología del asma y la rinitis resultan de estudios en humanos y de modelos animales, pero es necesaria cierta cautela en la extrapolación a partir de datos obtenidos en estos modelos experimentales para tratar de entender lo que está sucediendo en estas dos patologías. El asma y la rinitis son procesos inflamatorios iniciados por diferentes moléculas (inocuas y/o nocivas para el epitelio respiratorio) que inducen la liberación de citocinas tales como IL-33, IL-25 y TSLP, las cuales son capaces de promover el desarrollo de Th2 específicos de alérgenos altamente polarizadas¹⁹.

Estos linfocitos, productores de grandes cantidades de IL-4, IL-5 e IL-13, juntamente con moléculas liberadas por células cebadas y eosinófilos dañan las mucosas de las vías respiratorias¹¹⁻¹⁴.

Evidencias más reciente sugieren que otros tipos celulares también contribuyen al desarrollo de estos procesos inflamatorios: células linfoides innatas tipo II^{15,16}, células dendríticas¹⁷, células Th17¹⁸⁻²¹ y distintos tipos de células T reguladoras^{22,23}.

Independientemente de la causa y/o niveles de gravedad, los pacientes pueden experimentar exacerbaciones agudas, a menudo en asociación con infecciones respiratorias producidas por ciertos virus²⁴. Recientemente se han obtenido evidencias de que el virus influenza puede promover hiperreactividad de vías aéreas independientemente del sistema inmune adaptativo, mediante la inducción de IL-33 que activa células linfoides innatas productoras de IL-13 con efectos directos sobre células del epitelio respiratorio y musculares lisas²⁵. El virus respiratorio sincitial puede inducir la expresión y bioactividad de indolamina 2,3-dioxigenasa por células dendríticas, enzima que induce la apoptosis selectiva de linfocitos Th1 y contribuye a respuesta inmune sesgada a un perfil Th2²⁶.

El asma habitualmente comienza en la infancia o durante la adolescencia. Muchos niños que han tenido eccema o alergia digestiva en la infancia, seguido de rinitis (fenotipo atópico) terminan desarrollando asma, lo que es conocido como *la marcha alérgica*. Parecería que el fenotipo atópico se hereda de manera diferente que la tendencia al asma. Si bien las rinitis más comunes son las atópicas, también hay numerosos casos de rinitis no atópicas (infecciosa, hormonal, por drogas o alimentos, etc.). Alrededor de un 70% de casos de asma está asociado con individuos atópicos, pero la sensibilización atópica no es esencial ni suficiente para el desarrollo de esta condición patológica. En el 30% restante de los pacientes, el asma puede no estar asociada con IgE y puede ser desencadenada por diferentes estímulos no inmunológicos.

El objetivo de nuestro trabajo fue investigar las concentraciones de inmunoglobulinas séricas y salivales (totales y específicas para *Dermatophagoides pteronyssinus*) y el perfil de subpoblaciones linfocitarias circulantes en dos grupos: uno de niños atópicos (A) con asma/rinitis, no sometidos a inmunoterapia, y otro con una clínica similar pero sin evidencias de enfermedad atópica (NA).

MATERIALES Y MÉTODOS

TIPO DE ESTUDIO

Investigación transversal sobre parámetros inmunológicos en dos grupos de niños con rinitis/asma. Un grupo que según la anamnesis, examen físico y *prick test* para alérgenos inhalantes fue clasificado como grupo A, monosensibili-

TABLA I. Poblaciones leucocitarias en ambos grupos (no atópicos y atópicos).

	Glóbulos blancos Células/ μ l Media (DE)	Neutrófilos % Media (DE)	Eosinófilos % Media (DE)	Monocitos % Media (DE)	Linfocitos % Media (DE)
No atópicos	7.612,76 (2.118,46)	44,36 (10,61)	5,88 (2,92)	9,00 (3,20)	41,04 (10,16)
Atópicos	8.400,94 (2.049,74)	44,22 (9,37)	9,96 * (3,46)	8,50 (2,09)	37,65 (9,32)

* $p=0,008$.

zado a *D. pteronyssinus* (atópico); y otro grupo que luego de similar examen y con *tests* cutáneos negativos para todos los alérgenos inhalantes estudiados fue considerado como NA.

COMITÉ DE ÉTICA Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Este estudio de investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Polo Sanitario del Niño y del Adulto, y registrado en el Registro Provincial de Investigación en Salud (RePIS) con el N° 1183. El estudio se realizó de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. Se solicitó consentimiento informado a los padres y asentimiento a los niños mayores de 7 años.

PACIENTES

Niños de ambos sexos, de 6 a 15 años de edad, de igual condición social en la ciudad de Córdoba que concurrieron a la División de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de la ciudad de Córdoba y consultaron con síntomas compatibles de enfermedad alérgica respiratoria (rinitis/asma). Todos fueron evaluados clínicamente (examen físico y anamnesis) para descartar otras patologías y ninguno estaba con tratamiento inmunológico (esteroides sistémicos y/o inhalatorios, inmunosupresores, inmunoterapia específica) previo o al momento de la consulta y de la realización de los estudios *in vivo* e *in vitro*.

EVALUACIÓN CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO

Se realizó anamnesis, examen físico y *prick tests* para *D. pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Alternaria*, *Chaetomium*, *Cladosporium* y *Fusarium*, controles con solución salina e histamina glicerinada con *kit* de *Allergo Pharma* en cara anterior del antebrazo como ha sido previamente descrito²⁷. Como resultado de estos estudios los pacientes fueron divididos en dos grupos: el grupo atópico tuvo $n=25$ (15 varones, 10 mujeres) y el grupo no atópico tuvo $n=22$ (12 varones, 10 mujeres).

MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se obtuvieron diferentes muestras biológicas (sangre entera, suero y saliva) el mismo día de cada niño que participó de esta investigación, luego de comprobar ausencia de cuadro febril, resfrío e infecciones.

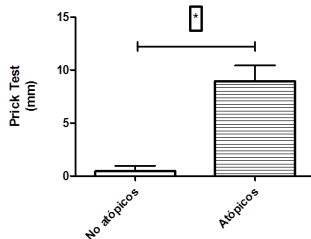
- **Sangre entera:** se extrajo, por punción venosa, 1 ml de sangre a la cual se adicionó 20 μ l de anticoagulante EDTA tripotásico.
- **Suero:** se obtuvo a partir de sangre venosa recogida sin anticoagulante y centrifugada a 3500 rpm por 5 minutos. El suero fue extraído, colocado en tubo *ependorf* y conservado en un *freezer* de -80 °C hasta su uso.
- **Saliva:** la recolección de la muestra de saliva se realizó por la mañana antes de la extracción de sangre. El paciente debió cumplir con las indicaciones de no comer dos horas antes de la toma de muestra y no realizar el lavado de dientes esa mañana. Se utilizó el método de goteo pasivo que ha sido previamente descrito²⁸. De manera resumida, la muestra fue recolectada de la siguiente manera: se le pidió al paciente que trague saliva para vaciar la boca, y luego de permanecer en reposo con los ojos abiertos y la cabeza ligeramente inclinada hacia delante durante 2 minutos sin tragar, la saliva fue recolectada en un recipiente, transferida a un tubo *ependorf*, centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos, y conservada en un *freezer* de -80 °C hasta su uso.

ESTUDIOS IN VITRO

- **Determinación de poblaciones leucocitarias:** el recuento de glóbulos blancos se realizó a partir de sangre entera utilizando un contador hematológico Sysmex XT 2000i.
- **Determinación de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica:** para el estudio de subpoblaciones linfocitarias T y B (porcentajes y valores absolutos) se utilizaron anticuerpos monoclonales (Acm) marcados con diferentes fluorocromos, citometría de flujo (FACS) con un *Citómetro Coulter Epics XL*, programa *System II*, y una Plataforma Dual o Múltiple (CDC 1997). Se utilizó la siguiente combinación de Acm (combinación de 3 marcadores por tubo) para cada individuo: Tubo 1: control de autofluorescencia; Tubo 2: CD8 (FITC)/CD4 (PE)/CD3 (PCy5) (*Trichrome, CoulterImmunotech*); Tubo 3: IgD (FITC)/CD27 (PE)/CD19 (PCy5) (*CoulterImmunotech*). En tubos de citómetro se incubaron 100 μ l de sangre con los Acm durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad, luego se lisaron los glóbulos rojos con CINH4 durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad; y finalmente los tubos fueron analizadas en el citómetro. Se identificaron los linfocitos de acuerdo con su posición en un gráfico de tamaño (*forward scatter* [FS]) versus granularidad (*side scatter* [SS]). Se

Tabla 2. Subpoblaciones linfocitarias en ambos grupo (no atópicos y atópicos).

	Glóbulos blancos cél/µl Media (DE)	Linfocitos % Media (DE)	Linfocitos cél/µl Media (DE)	CD3 % Media (DE)	CD3 cél/µl Media (DE)	CD4 % Media (DE)	CD4 cél/µl Media (DE)	CD8 % Media (DE)	CD8 cél/µl Media (DE)	Relación CD4/ CD8 Media (DE)	CD19 % Media (DE)	CD19 cél/µl Media (DE)
No atópicos	7612,76 (2118,46)	41,04 (10,16)	3024,16 (785,95)	72,59 (5,94)	2184,76 (541,84)	38,16 (5,47)	1132,00 (251,87)	27,99 (4,42)	861,48 (304,39)	1,40 (0,35)	15,68 (6,32)	506,40 (270,12)
Atópicos	8400,94 (2049,74)	37,66 (9,32)	3142,34 (1112,95)	70,66 (6,48)	2198,28 (728,65)	35,12 (7,23)	1082,94 (418,10)	26,78 (4,28)	839,91 (300,58)	1,35 (0,43)	15,16 (3,85)	500,28 (229,24)

**Figura 1.** Resultados de prick test para *Dermatophagoides pteronyssinus* en ambos grupos de pacientes.

contaron 5000 elementos en la ventana (*gate*) de linfocitos o de linfocitos B (CD19⁺). El recuento celular se expresó en valores absolutos y porcentajes. Se identificaron fenotípicamente las siguientes poblaciones celulares: Linfocitos T (CD3⁺/CD19⁻), linfocitos T cooperadores (CD3⁺/CD4⁺), linfocitos T citotóxicos/supresores (CD3⁺/CD8⁺), linfocitos B (CD3⁻/CD19⁺), linfocitos B CD19⁺/IgD⁺/CD27⁻, linfocitos B CD19⁺/IgD⁺/CD27⁺, linfocitos B CD19⁺/IgD⁻/CD27⁺, y linfocitos B CD19⁺/IgD⁻/CD27⁺⁺.

CUANTIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS SÉRICAS

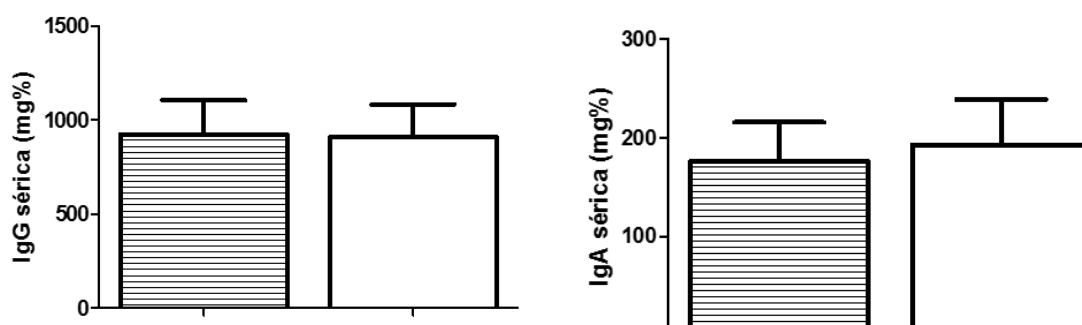
- **IgG e IgA:** se utilizó la técnica de IDRS²⁹. Para confeccionar las placas se preparó una solución madre de agar (*Noble Sigma*) al 3% en agua destilada. En el momento del estudio se la mezcló en partes iguales con solución fisiológica y luego de llevarla en baño termostático a una temperatura de 56 °C se agregó el antisuero monoespecífico (*International Immunology Co. CA, USA*) en una dilución apropiada, habitualmente entre 1/100 a 1/200. Inmediatamente 3 ml de esta mezcla se depositaron sobre una placa de vidrio de 2,5 × 7,5 cm previamente ubicada en situación de perfecta horizontalidad. Luego de gelificar se mantuvo en heladera durante una hora. Los reservorios de siembra se efectuaron con sacabocado metálico de 4 mm de diámetro. Se sembraron como testigos 3 diluciones de es-

tándares de concentraciones conocidas (*Rockland, PA, USA*). Las muestras en estudio fueron apropiadamente diluidas y sembradas con micropipeta *Hamilton* de 5 µl. Se dejó migrar en cámara húmeda durante 48 horas a temperatura ambiente y luego con lupa milimetrada se registraron los diámetros de los halos de precipitación. Con las lecturas del *Standard* se efectuó en papel milimetrado un gráfico de diámetro al cuadrado en función de la concentración expresada en mg%, las lecturas de los diámetros de las muestras problemas fueron llevadas a esta gráfica y por extrapolación se determinó su concentración.

- **IgE sérica total:** se utilizó la técnica de *Total IgE IRMA* (*Siemens Healthcare Diagnostics, CA, USA*). En tubos de plástico con anticuerpo monoclonal anti-IgE adosado a sus paredes, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, diluciones apropiadas de estándares de IgE y sueros problema. Luego de 3 lavados y perfecto escurrimiento por inversión, se agregó antisuero monoclonal anti-IgE marcado con yodo 125 y se incubó durante 24 hs en heladera. Luego de repetir la serie de lavados y escurrimiento, se efectuaron las lecturas de la radiactividad expresadas en cpm en un contador gamma (contador de pozo *Alfa Nuclear*). Con las lecturas de los estándares de IgE de concentración conocida se efectuó en papel semilogarítmico una curva de las cpm obtenidas, expresadas como un porcentaje de la radiactividad total, en función de la concentración de IgE. Las lecturas de las muestras problema fueron referidas a la gráfica y por extrapolación se determinó su concentración de IgE expresada en UI/ml.
- **-IgE sérica específica para *D. pteronyssinus*:** se utilizó el radioinmunoensayo en fase sólida (RAST)³⁰. Para capturar la IgE específica, en tubos de plástico, sueros testigos y problemas se incubaron durante 24 horas en heladera con discos de papel de filtro sensibilizados mediante uniones covalentes con antígenos del ácaro *D. pteronyssinus* (*Cypress Diagnostics, Hulshout, Bélgica*). Luego de lavar cuidadosamente los discos, se agregó un monoclonal anti-IgE marcado con yodo 125 (*Siemens Healthcare Diagnostics, CA, USA*) y se repitió el tiempo y temperatura de la primera incubación. Luego de los lavados de rigor, se leyó la radiactividad expresada en cpm en un contador de pozo

Tabla 3. Subpoblaciones de linfocitos B en ambos grupos (no atópicos y atópicos).

	CD19 % Media (DE)	CD19 cél/µl Media (DE)	B (IgD ⁺ /CD27 ⁻) % Media (DE)	B (IgD ⁺ /CD27 ⁻) cél/µl Media (DE)	B CD27 ⁺ (IgD ⁺) % Media (DE)	B CD27 ⁺ (IgD ⁺) cél/µl Media (DE)	B CD27 ⁻ (IgD ⁻) % Media (DE)	B CD27 ⁻ (IgD ⁻) cél/µl Media (DE)	B (Totales) (CD19 ⁺ /CD27 ⁺) % Media (DE)
No atópicos	15,68 6,32	506,4 270,12	78,76 8,30	408,97 248,41	7,69 4,03	36,13 22,06	7,41 4,17	32,90 17,53	15,15 6,98
Atópicos	15,16 3,85	500,28 229,24	77,03 6,13	390,72 197,21	8,63 3,88	42,51 26,59	7,96 4,46	37,09 23,59	15,69 5,58

**Figura 2.** Concentraciones de inmunoglobulinas séricas en ambos grupos de pacientes. A (IgG), B (IgA).

gamma. Las lecturas de los sueros testigos permitieron por comparación la clasificación de los sueros problemáticos. En todos los ensayos se procesaron 5 testigos de concentración conocida de IgE específica para el ácaro en estudio, lo cual permitió graduar la positividad en: normal (0 PRU), \pm (0,1-0,4 PRU), + (0,5-1 PRU), ++ (1,2-2 PRU), +++ (2,1-3 PRU), ++++ (> 4 PRU).

CUANTIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINA A SALIVAL (IgAs)

- **IgAs total:** para el dosaje de IgAs en saliva se utilizó la técnica de IDRS²⁹. Se siguió el procedimiento ya descrito en el dosaje de inmunoglobulinas, utilizando en este caso un antisuero policlonal anti cadena pesada alfa. Como testigo se utilizó un estándar de IgA sérica monomérica (Rockland, PA, USA). La IgAs es una molécula dimérica lo cual plantea una asimetría con el testigo, esto se corrige multiplicando la concentración de IgAs obtenida por un factor de corrección ya descrito previamente³¹ y que en este trabajo tuvo un valor de 2,5.
- **IgAs específica para *D. pteronyssinus*:** para la detección de IgAs específica para *D. pteronyssinus* se utilizaron kits comerciales de ELISA de captura en fase sólida (Human Allergen Specific IgA ELISA Assay) de Diagnostic Automation, Inc (CA, USA) siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante. Las determinaciones se realizaron con muestras de saliva diluidas 1:15. Los resultados de IgAs específica para *D. pte-*

ronyssinus en cada paciente se expresaron como el cociente entre las unidades de densidad óptica (DO) obtenidas en el ELISA y los mg de IgAs total.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calculó la media y el desvío estándar (DE) para las concentraciones de IgG, IgA e IgE séricas, y de IgAs para ambos grupos. Los mismos cálculos fueron realizados para determinar porcentajes y valores absolutos de poblaciones leucocitarias y subpoblaciones linfocitarias. Dichos valores fueron evaluados utilizando diferentes pruebas (*Student*, *Mann-Whitney* y *Spearman*), considerando una $p < 0,05$ como estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Demografía. Los valores demográficos para los dos grupos de pacientes fueron semejantes. El grupo atópico (A) estuvo constituido por 25 individuos (15 varones, 10 mujeres) y el grupo no atópico (NA) formado por 22 individuos (12 varones, 10 mujeres). Las edades media, las desviaciones estándar (DE) y los rangos de edad de los individuos pertenecientes al grupo A y al grupo NA fueron: $8,92 \pm 2,48$ años (rango: 6-12) y $8,13 \pm 1,9$ años (rango: 6-13), respectivamente.

Diagnóstico. Luego de la realización de anamnesis, del examen físico y de *prick tests* se generaron dos grupos de

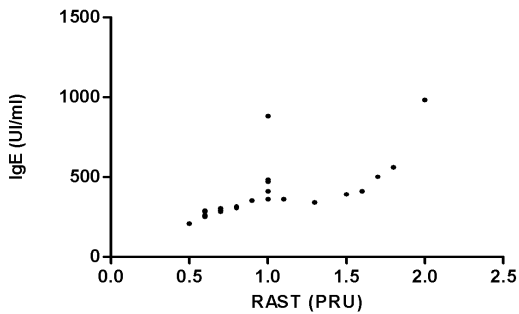


Figura 3. Correlación entre niveles de IgE total e IgE específica para *Dermatophagoides pteronyssinus* en pacientes pertenecientes al grupo atópico.

estudio. Los pacientes NA tuvieron todos los *prick tests* negativos mientras que los pacientes A tuvieron *prick tests* positivos solamente para *D. pteronyssinus*. La **Figura 1** muestra los valores de *tests* cutáneos para dicho alérgeno en ambos grupos. El grupo A estuvo formado por 22 casos de asma/rinitis y 3 de rinitis; y en el grupo NA hubo 12 casos de asma/rinitis, 1 de asma y 9 de rinitis.

Estudios *in vitro*. Todos estos estudios se realizaron el mismo día utilizando diferentes muestras biológicas (sangre entera, suero y saliva) que fueron recolectadas como se indicó en materiales y métodos, luego de comprobar ausencia de cuadro febril, resfrío o infecciones.

- **Recuento de glóbulos rojos y valores hematimétricos.** Los valores de glóbulos rojos, plaquetas, y otros parámetros hematimétricos estuvieron comprendidos dentro de los valores de referencia para dicho grupo etario y fueron similares entre el grupo NA y el grupo A.
- **Determinación de poblaciones leucocitarias.** Como se puede observar en la **Tabla 1**, el recuento total de glóbulos blancos demostró valores normales (absolutos y porcentuales) para ambos grupos. Entre las subpoblaciones leucocitarias solo se observó un aumento significativo en el porcentaje de eosinófilos en el grupo A ($p=0,008$). Los valores normales de leucocitos totales, neutrófilos, monocitos y linfocitos en todos los individuos del estudio indican la ausencia de procesos infecciosos al momento de la recolección de muestras.
- **Determinación de subpoblaciones linfocitarias.** El estudio de subpoblaciones linfocitarias fue realizado mediante FACS. Los valores hallados (porcentajes y valores absolutos) para linfocitos T totales, subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺, y la relación CD4⁺/CD8⁺, así como los valores de linfocitos B totales arrojaron resultados normales para individuos de estas edades y no hubo ninguna diferencia para todos esos resultados entre el grupo A y el grupo NA (**Tabla 2**).
- **Cuantificación de inmunoglobulinas IgG e IgA en suero.** Las concentraciones de IgG e IgA en suero estuvieron dentro del rango de normalidad para niños

de estas edades en ambos grupos estudiados. En el grupo NA los valores de media y DE para IgG e IgA fueron de 924 ± 198 mg% (rango: 651-1226) y $178,4\pm 42$ mg% (rango: 98-235), respectivamente, mientras que en el grupo A los valores de media y DE para IgG e IgA fueron de $909,2\pm 174,3$ mg% (rango: 662-1226) y $192,7\pm 46$ mg% (rango: 86-260), respectivamente. Como se observa en la **Figura 2** al comparar las concentraciones de estas dos inmunoglobulinas entre los grupos NA y A, no se detectan diferencias con significación estadística entre ambas poblaciones.

- **IgE sérica total.** Las concentraciones de IgE sérica total fueron, como era esperable, significativamente mayores ($p<0,0001$) en el grupo A con respecto al grupo NA ($394,4\pm 183$ UI/ml; rango: 208-980 *versus* $71,6\pm 38,2$ UI/ml; rango: 20-140, respectivamente).
- **IgE sérica específica para *D. pteronyssinus*.** Los valores de IgE específica de alérgeno fueron negativos (0 PRU) en todos los individuos pertenecientes al grupo NA, mientras que los pacientes pertenecientes al grupo A tuvieron valores positivos en un rango de 0,5 a 2 PRU. Hubo una correlación significativa ($r=0,9$; $p<0,0001$) entre los valores PRU y las concentraciones de IgE totales en el grupo A (**Figura 3**). También existió una correlación positiva entre los valores de *prick* y los de RAST ($r=0,7$; $p<0,03$).
- **Cuantificación de IgAs total.** Como se puede observar en la **Figura 4A**, los valores de IgAs totales fueron significativamente mayores ($p=0,0015$) en el grupo NA ($24,54\pm 5,98$ mg%; rango: 14-34,5) que en el grupo A ($18,86\pm 5,69$ mg%; rango: 10-35). Como controles negativos se utilizaron dos muestras de pacientes con déficit selectivo de IgA.
- **IgAs específica para alérgenos (*D. pteronyssinus*).** Para nuestra sorpresa, la cantidad de IgAs específica para *D. pteronyssinus*/mg de IgAs total fue casi dos veces mayor en el grupo de individuos A con respecto al grupo NA ($1,921\pm 0,42$ *versus* $1,005\pm 0,24$; $p<0,0001$) (**Figura 4B**). De igual manera que para el estudio de IgAs total cuando se estudió la IgAs específica para alérgeno, se utilizaron como control negativo muestras de pacientes con déficit selectivo de IgA. No hubo correlación significativa cuando se compararon los valores individuales de IgAs total con los niveles de IgE total, ni entre los valores individuales de IgAs específica para *D. pteronyssinus* e IgE específica para este alérgeno en el grupo de individuos A.
- **Determinación de subpoblaciones de linfocitos B.** Los resultados obtenidos para el estudio por FACS de las subpoblaciones de linfocitos B se resumen en la **Tabla 3**. No hubo diferencias significativas entre los porcentajes de linfocitos B CD27⁻ y de linfocitos B CD27⁺ en ambos grupos. Las medias \pm DE fueron de $78,76\pm 8,30$ y $77,03\pm 6,13$ para NA y A, y de $15,15\pm 6,98$ y $15,69\pm 5,58$ para NA y A, respectivamente. Alrededor de un 50% de los linfocitos B CD27⁺ totales fueron IgD⁺ (sin *switch* de Ig de membrana) y el

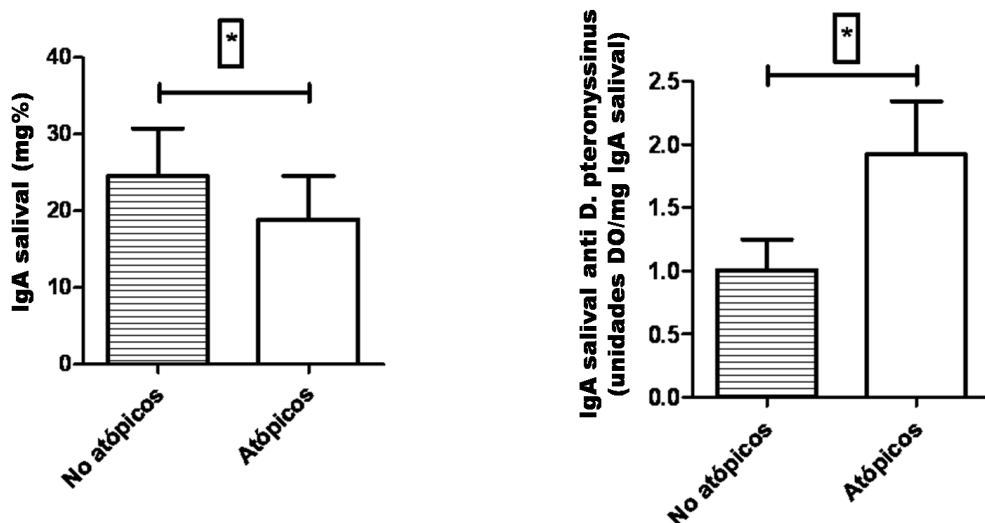


Figura 4. Niveles de IgAs total (A) e IgAs específica para *Dermatophagoides pteronyssinus* (B) en pacientes pertenecientes a ambos grupos.

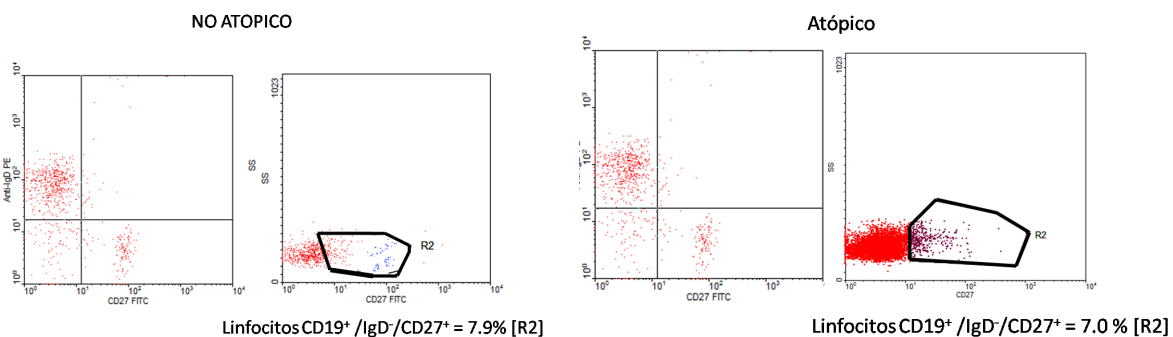


Figura 5. (A) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺/IgD⁻/CD27⁺ [R2] en un individuo representativo del grupo no atópico. (B) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺/IgD⁻/CD27⁺ [R2] en un individuo representativo del grupo atópico.

otro 50% fueron IgD⁻ (con *switch* de Ig de membrana) en el grupo A como en el grupo NA (Tabla 3). La Figura 5 muestra un caso representativo de dichas subpoblaciones de linfocitos B.

Sin embargo, en el grupo A encontramos una disminución significativa con respecto al grupo NA en una subpoblación dentro de los linfocitos CD19⁺/IgD⁻/CD27⁺. Dicha población tiene una muy intensa expresión de las moléculas CD27 y se la designa fenotípicamente como linfocitos CD19⁺/IgD⁻/CD27⁺⁺⁺. Los valores hallados fueron: 2,7%±0,5 en el grupo NA vs. 1,7%±0,6 en el grupo A (p=0,044). Un caso representativo de pacientes para ambos grupos se muestra en la Figura 6. La mayoría de estas células tienen un tamaño superior a los linfocitos convencionales cuando fueron medidos por FACS (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

El asma y la rinitis son enfermedades comórbidas que se asocian epidemiológicamente y también en su fisiopatología.

Más del 80% de las personas con asma tienen rinitis, y esta última enfermedad constituye un factor de riesgo para el desarrollo de asma³². Porcentajes similares encontramos en nuestro estudio ya que en el grupo atópico (niños sensibilizados a *D. pteronyssinus*) el 88% de pacientes tienen asma y rinitis, mientras que en el grupo no atópico el porcentaje fue del 54%. Es importante recordar que este alérgeno es considerado uno de los principales factores etiológicos de asma/rinitis.

El diagnóstico correcto de estas dos enfermedades es muy importante para su adecuado tratamiento. El asma es un trastorno multifactorial complejo que involucra una variedad de diferentes mecanismos, con influencias genéticas y ambientales entrelazadas, lo que resulta en fenotipos clínicos heterogéneos. Debido a la complejidad y multiplicidad de los fenotipos de asma, no hay una única manera para la confirmación o la exclusión del diagnóstico. El diagnóstico se basa en una historia de síntomas respiratorios episódicos con obstrucción del flujo aéreo, combinado con hallazgos físicos, mediciones objetivas de la obstrucción de la

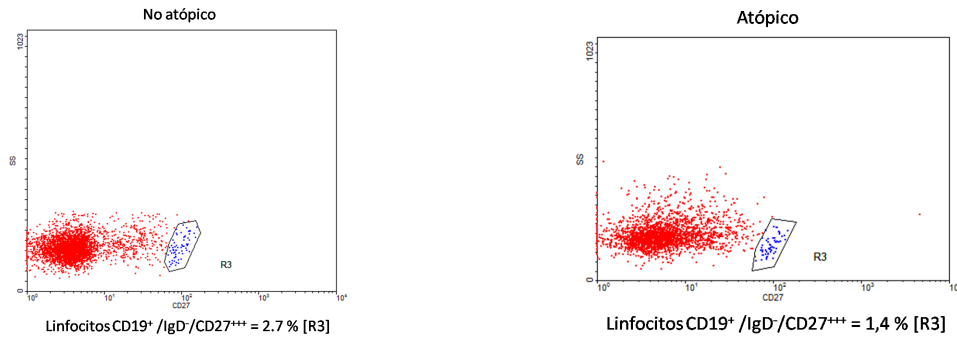


Figura 6. (A) Porcentaje de linfocitos CD19⁺/IgD⁻/CD27⁺ [R3] en un individuo representativo del grupo atópico. (B) Porcentaje de linfocitos CD19⁺/IgD⁻/CD27⁺ [R3] en un individuo representativo del grupo atópico.

vía aérea, y la reversibilidad. Para el diagnóstico de rinitis es muy importante una historia ambiental detallada, la detección de congestión nasal, prurito, rinorrea, estornudos; el patrón de dichos síntomas (estacional o perenne, intermitente o persistente); factores precipitantes; respuesta a los medicamentos anteriores; etc. Todos estos síntomas y signos fueron tenidos en cuenta durante el examen físico de los pacientes incluidos en este trabajo de investigación. Nosotros realizamos pruebas cutáneas no solo para confirmar el diagnóstico de asma/rinitis atópico³³, sino para tener también indicaciones de los riesgos de padecer síntomas y sensibilizaciones como ha sido recientemente reportado en un gran estudio prospectivo de la Global Asthma and Allergy European Network³⁴.

En este trabajo de investigación las diferencias inmunológicas entre ambos grupos de pacientes y la confirmación de que uno de los grupos de niños con asma/rinitis era atópico (grupo A) se logró mediante estudios *in vitro* para valorar poblaciones leucocitarias, y el nivel y especificidad de anticuerpos tipo IgE. Las técnicas utilizadas para estos estudios han evolucionado desde que *Pharmacia Diagnostics AB* desarrolló el RAST en 1974 y en 1989 lo reemplazó por el *ImmunoCAP* con un mejor límite de detección. Más recientemente, técnicas para cuantificar IgE de manera específica y simultánea para múltiples alérgenos recombinantes (*Allergen microarray*) han sido desarrollados y perfeccionadas^{35,36}, y en el año 2013 la *WAO-ARIA-GA²LEN* publicó un documento de consenso el cual proporciona una guía práctica para las indicaciones, la determinación y la interpretación de los diagnósticos utilizando dichas metodologías para los médicos formados en alergología³⁷. Las ventajas y desventajas de este ensayo comparado con otras pruebas tanto *in vitro* como *in vivo* han sido recientemente evaluadas por expertos³⁸.

Utilizando técnicas de radioinmunoanálisis para valorar IgE total y específica para *D. pteronyssinus* encontramos valores superiores a los límites de normalidad solamente en pacientes pertenecientes al grupo A. Hubo una excelente correlación entre niveles totales de IgE y niveles específicos de IgE para *D. pteronyssinus*, y entre los valores

de *prick* y RAST para este alérgeno. Además, el grupo de niños A tuvo un aumento significativo de eosinófilos comparado con el grupo NA.

Aunque estas enfermedades no se pueden curar, la mayoría de los pacientes responden bien a tratamientos farmacológicos (reducción de la inflamación, control de los síntomas y prevención de exacerbaciones agudas)^{39,40}; pero en otros pacientes las respuestas a los tratamientos son más heterogéneas y la enfermedad es más difícil de controlar⁴¹. Varias recomendaciones y revisiones sobre manejo de rinitis y asma se han publicado durante los últimos años⁴²⁻⁴⁴.

Además de los tratamientos farmacológicos existen otras herramientas terapéuticas para estas enfermedades, entre ellas podemos mencionar el tratamiento con un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 anti-IgE específico para el epítipo que utiliza esta molécula para unirse a los receptores FcεRI y FcεRII⁴⁵. Ha demostrado ser efectivo atenuando las respuestas tempranas y de fase tardía después de la exposición al alérgeno y la principal indicación es como complemento en la terapia de los pacientes con asma severo, aunque su uso es limitado por su costo⁴⁶.

Sin embargo, el único tratamiento capaz de modificar la historia natural de asma/rinitis es la inmunoterapia específica de alérgeno (IT). Desde la primera publicación científica sobre este tema realizada en el año 1911⁴⁷, se ha avanzado tanto, que solo en los 2 últimos años existen 120 revisiones publicadas en revistas indexadas en PubMed. Como lo indican las siguientes revisiones, la IT es considerada en la actualidad una alternativa segura, eficiente y de larga duración para el tratamiento de asma, rinitis, dermatitis, alergia alimentaria en adultos y niños⁴⁸⁻⁵⁹.

La IT sublingual (ITSL) induce aumento de factores proreguladores como la IL-10, TGF-beta e IFN gamma, disminución de IL-13 e IL-17, aumento de células T reguladoras, disminución de moléculas de adhesión en los endotelios, disminución de Th2, IgE y eosinófilos⁶⁰. Si bien se ha demostrado que la IT induce isotipos de IgG bloqueantes para ciertos alérgenos⁶¹ no hay datos sobre el rol de IgAs en este tipo de terapia. Es importante destacar que esta inmunoglobulina es producida fundamentalmente en

respuesta a antígenos que ingresan por mucosas⁶², y que por lo tanto su producción elevada podría tener efectos beneficiosos en ITSL.

Jutel M *et al.* estudiaron hace unos años la inmunidad de individuos normales al *D. pteronyssinus* y polen de abedul, y observaron una supresión de linfocitos periféricos Th1 y Th2 inducida por linfocitos T específicos de alérgenos que producían IL-10 y TGF-beta. Los autores mencionan en dicho trabajo que una situación similar ocurriría como consecuencia de la utilización de IT⁶³. Esto implicaría que los individuos normales tienen a través de este mecanismo buenas cantidades de anticuerpos específicos para alérgenos tipo IgA y los individuos atópicos, no. Si bien TGF-beta induce la activación de células B y cambio de isotipo hacia IgA, sus efectos regulatorios pueden ser mediados por muchos otros mecanismos ya que esta citocina es muy pleiotrópica y se conoce que afecta a las células T, a la presentación de antígenos, a las funciones efectoras de los macrófagos, a la expresión de moléculas HLA de clase I y II, de CD40 e IL-12.

Aydogan M *et al.* estudiaron inmunoglobulinas séricas específicas para alérgeno en un grupo de niños con asma y un grupo de niños saludables, y observaron que los niveles de IgG1, IgG4 e IgE de pacientes asmáticos fueron significativamente mayores que en los controles sanos; y que la relación IgA/IgE fue menor en los enfermos. Además, los niveles séricos de inmunoglobulinas específicas de alérgeno fueron superiores cuando la duración de la enfermedad era superior a los cuatro años⁶⁴.

Es interesante mencionar que en nuestro trabajo, si bien las concentraciones de IgAs totales fueron inferiores en el grupo de niños A, los niveles de IgAs específica para *D. pteronyssinus* fueron el doble en el grupo de individuos A con respecto al grupo NA. Esto claramente indica que los niños A no solamente producen cantidades elevadas de IgE específica sino que también tienen cantidades importantes de IgAs específica para el alérgeno.

Miranda *et al.* investigaron los niveles de IgE, IgG4 e IgA para *D. pteronyssinus* en muestras de niños alérgicos y en niños saludables, encontrando que anticuerpos IgA predominan en los niños no alérgicos, mientras que IgE e IgG4 son más frecuente en los niños alérgicos⁶⁵.

Antes del advenimiento de CD27 como marcador general para los linfocitos B de memoria humanos, la expresión de IgD típicamente se utilizó para indicar la existencia de poblaciones de células B vírgenes, y la expresión de IgG e IgA evidenciaba una previa exposición a un antígeno y la existencia de linfocitos B de memoria. En 1990, Maurer *et al.* descubren una población de células B que expresan un marcador de células T, el CD27. Debido a que los linfocitos B CD27⁺ tienen mayor tamaño citoplasmático que los linfocitos B CD27⁻, están en alta prevalencia en la sangre periférica de adultos pero no está presente en la sangre

del cordón umbilical, y producen altos títulos de IgG después de ser estimulados, llevó a los autores a especular que estas células eran "preactivadas"^{66,67}. En 1998, dos publicaciones simultáneas demostraron que las células B CD27⁺, que también expresan CD148, tienen un gran aumento de mutaciones somáticas en los genes variables de inmunoglobulinas, lo que le dio más sustento a la idea de que este subgrupo de linfocitos B eran de memoria^{68,69}.

En nuestro trabajo, cuando utilizamos un anticuerpo anti-CD27 para investigar estas dos subpoblaciones de linfocitos B no encontramos diferencias significativas entre los porcentajes de linfocitos B CD27⁻ y de linfocitos B CD27⁺ entre ambos grupos de pacientes. Esta última población de células B representó 1/5 del total de los linfocitos B y aproximadamente la mitad de ellos fueron IgD⁺ (sin *switch* de Ig de membrana) y el otro 50% fueron IgD⁻ (con *switch* de Ig de membrana) tanto en el grupo A como en el grupo NA. Como se puede apreciar en todo nuestro trabajo, no hablamos de linfocitos B de memoria ya que no hace muchos años fue descubierto que las células B de memoria son heterogéneas y algunas de ellas son CD27⁻. Por lo tanto, el antígeno CD27 es incapaz de caracterizar completamente todos los subconjuntos de células B de memoria, y algunas de estos linfocitos no expresan este marcador⁷⁰.

Lo dicho anteriormente se refiere a las subpoblaciones de linfocitos B-2 (comúnmente llamados linfocitos B convencionales) pero no nos debemos olvidar de los linfocitos B-1 que en humanos expresan CD 27, pero se diferencian fenotípicamente de los linfocitos B convencionales CD 27⁺ porque son CD 43⁺⁷¹. Las células B-1 secretan anticuerpos naturales y juegan un papel crítico en la defensa contra la invasión microbiana, en la eliminación de los restos celulares, pero también regulan la expansión y diferenciación de células T^{72,73}. Por lo tanto, para poder realmente caracterizar todas estas subpoblaciones de linfocitos B hay que utilizar FACS con dos láseres y anticuerpos no solo contra CD19, CD27 e Igs, sino también contra FCRL4, CD43 y CD70.

Interesantemente en nuestro estudio encontramos en el grupo A una disminución significativa con respecto al grupo NA de una subpoblación dentro de los linfocitos CD19⁺/IgD⁻/CD27⁺. Dicha población tiene una muy intensa expresión de las moléculas CD27 y se la designa fenotípicamente como linfocitos CD19⁺/IgD⁻/CD27⁺⁺⁺. Dichas células han sido definidas como linfoplasmocitos, y además de tener una alta expresión de CD27 también expresan CD38⁷⁴.

Para concluir, podemos decir que a nuestro entender este trabajo es el primero que compara dos poblaciones de pacientes infantiles con asma y/o rinitis (en una población atópica y otra no atópica). Los otros trabajos que han estudiado isotipos específicos de inmunoglobulinas contra alérgenos han comparado poblaciones atópicas *versus* ni-

ños saludables. Nuestros resultados indican que el grupo de niños con asma y/o rinitis alérgicas, si bien producen menos IgAs total que el grupo de niños con asma y/o rinitis no alérgica, son capaces de producir no solamente altos niveles de IgE total y específica para el alérgeno, sino también IgAs específica para el mismo alérgeno al cual está

sensibilizado. Estos resultados deberían hacer revisar el concepto de que, por lo menos para alérgenos inhalados, uno de los mecanismos propuestos por el cual la ITSL sería efectiva es a través de la generación de anticuerpos bloqueantes tipo IgAs contra el alérgeno, ya que estos pacientes tienen altas concentraciones de dichos anticuerpos.

BIBLIOGRAFÍA

- Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, et al. Asthma and wheezing during the first 6 years of life. *N Engl J Med* 1995; 332: 133-138.
- Cookson W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 978-988.
- Jongepier H, Boezen HM, Dijkstra A, et al. Polymorphisms of the ADAM33 gene are associated with accelerated lung function decline in asthma. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 757-760.
- Ercan H, Birben E, Dizdar EA, et al. Oxidative stress and genetic and epidemiologic determinants of oxidant injury in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 1097-1104.
- Von Mutius E. The rising trends in asthma and allergic disease. *Clin Exp Allergy* 1998; 28(Suppl. 5):45-49.
- Zar HJ, Ehrlich RI, Workman L, Weinberg EG. The changing prevalence of asthma, allergic rhinitis and atopic eczema in African adolescents from 1995 to 2002. *Pediatr Allergy Immunol* 2007; 18: 560-565.
- Matricardi PM, Rosmini F, Rioldino S, et al. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *Br Med J* 2000; 320: 412-417.
- Riedler J, Braun-Fahlander C, Eder W, et al. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 2001; 358: 1129-1133.
- Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujinzeel-Koomen C, et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force.; EAACI (the European Academy of Allergology and Clinical Immunology) nomenclature task force. *Allergy* 2001; 56:813-24.
- Wambre E, James EA, Kwok WW. Characterization of CD4+ T cell subsets in allergy. *Curr Opin Immunol* 2012; 24:700-706.
- Pawankar R, Hayashi M, Yamanishi S, Igarashi T. The paradigm of cytokine networks in allergic airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2015; 15:41-48.
- Robinson DS, Hamid Q, Ying S, et al. Predominant "TH2-like" bronchoalveolar lavage T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326: 298-304.
- Bradding P, Roberts JA, Britten KM, et al. Interleukins-4, -5, -6 and TNF-alpha in normal and asthmatic airways. Evidence for the human mast cell as an important source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10:471-480.
- Krug N, Madden J, Redington AE, et al. T-cell cytokine profile evaluated at the single cell level in BAL and blood in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 14: 319-326.
- Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just Th2 cells. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:838-48.
- Scanlon ST, McKenzie ANJ. Type 2 innate lymphoid cells: new players in asthma and allergy. *Current Opinion in Immunology* 2012; 24:707-712.
- Brugha R, Mushtaq N, McCarthy NE, Stagg AJ, Grigg J. Respiratory tract dendritic cells in paediatric asthma. *Clin Exp Allergy* 2015; 45:624-31.
- Moler T, Hamid Q, Davoine F, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 430-438.
- Willis CR, Siegel L, Leith A, Mohn D, et al. IL-17RA Signaling Drives Airway Inflammation and Bronchial Hyper Reactivity in Allergic Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25919006.
- Sorbello V, Ciprandi G, Di Stefano A, Massaglia GM, et al. Nasal IL-17F is related to bronchial IL-17F/neutrophilia and exacerbations in stable atopic severe asthma. *Allergy* 2015; 70:236-240.
- Barczyk A, Pierzchala W, Caramori G, Wiaderkiewicz R, et al. Decreased percentage of CD4(+)Foxp3(+)TGF-beta(+) and increased percentage of CD4(+)IL-17(+) cells in bronchoalveolar lavage of asthmatics. *J Inflamm (Lond)* 2014; 11: 22.
- Böhm L, Maxeiner J, Meyer-Martin H, Reuter S, Finotto S, et al. IL-10 and regulatory T cells cooperate in allergen-specific immunotherapy to ameliorate allergic asthma. *J Immunol* 2015; 194: 887-897.
- Raker V, Stein J, Montermann E, Maxeiner J, et al. Regulation of IgE production and airway reactivity by CD4+ CD8- regulatory T cells. *Immunobiology* 2015; 220:490-499.
- Pattemore PK, Johnston SL, Bardin PG. Viruses as precipitants of asthma symptoms. I. Epidemiology. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 325-336.
- Chang YJ, Kim HY, Albacker LA, et al. Innate lymphoid cells mediate influenza induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. *Nat Immunol* 2011; 12:631-638.
- Ajamian F, Wu Y, Ebeling C, et al. Respiratory syncytial virus induces indoleamine 2,3-dioxygenase activity: a potential novel role in the development of allergic disease. *Clin Exp Allergy* 2015; 45:644-659.
- Bousquet J. Métodos in vivo para el estudio de la alergia: Pruebas cutáneas, técnicas e interpretaciones. Barcelona, España. En: *Alergia. Principios y práctica*. Salvat Editores.S.A. Tomo I. Pág. 398 - 399; 1992.
- Li TL, Gleeson M. The effect of single and repeated bouts of prolonged cycling and circadian variation on saliva flow rate, immunoglobulin A and alpha-amylase responses. *J Sports Sci* 2004; 22:1015-1024.
- Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1985; 2:235-254.
- Ceska M, Eriksson R, Varga JM. Radioimmunosorbent assays of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1972; 49: 1-9.
- Brandtzaeg P. Human Secretory Immunoglobulins. *Immunochemical and physicochemical studies of Secretory IgA and free Secretory Piece*. 1971. *Acta Path Microbiol Scand Section B* 79:165.
- Bousquet J, van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma: ARIA workshop report. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: S147-S334.
- Tschopp JM, Sistek D, Schindler C, et al. Current allergic asthma and rhinitis: diagnostic efficiency of three commonly used atopic markers (IgE, skin prick tests, and Phadiatop). Results from 8329 randomized adults from the SAPALDIA Study. *Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults*. *Allergy* 1998; 53:608-613.

34. Haahtela T, Burbach GJ, Bachert C, et al. Clinical relevance is associated with allergen-specific wheal size in skin prick testing. *Clin Exp Allergy*. 2014; 44:407-416.
35. Melioli G, Passalacqua G, Canonica GW. Novel in silico technology in combination with microarrays: a state-of-the-art technology for allergy diagnosis and management? *Expert Rev Clin Immunol* 2014; 10:1559-1561.
36. Nettis E, Bonifazi F, Bonini S, et al. Molecular diagnosis and the Italian Board for ISAC. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2014; 46:68-73.
37. Canonica GW, Ansotegui IJ, Pawankar R, et al. A WAO-ARIA-GA²LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organization Journal* 10/2013; 6:17.
38. Skrindo I, Lupinek C, Valenta R, et al. The use of the MeDALL-chip to assess IgE sensitization: a new diagnostic tool for allergic disease? *Pediatric Allergy Immunol* 2015; 26:239-246.
39. Lu M, Wu B, Che D, et al. FeNO and asthma treatment in children: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94:e347.
40. Wheatley LM, Togias A. Clinical practice. Allergic rhinitis. *N Engl J Med*. 2015;372:456-463.
41. Wechsler ME. Getting control of uncontrolled asthma. *Am J Med*. 2014; 127:1049-1059.
42. Scadding GK. Optimal management of allergic rhinitis. *Arch Dis Child*. 2015;100:576-582.
43. Boulet LP, FitzGerald JM, Levy ML, et al. A guide to the translation of the Global Initiative for Asthma (GINA) strategy into improved care. *Eur Respir J* 2012;39:12201229.
44. British Thoracic Society; Scottish Intercollegiate Guidelines Network. British guideline on the management of asthma. *Thorax*. 2014;69 Suppl 1:1-192.
45. Strunk RC, Bloomberg GR. Omalizumab for Asthma. *N Engl J Med* 2006; 354: 2689-2695.
46. Walker S, Monteil M, Phelan K, et al. Anti-IgE for chronic asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 2: CD003559.
47. Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 1911; 1:1572-1573.
48. Feng S, Xu Y, Ma R, et al. Cluster subcutaneous allergen specific immunotherapy for the treatment of allergic rhinitis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9:e86529.
49. Compalati E, Braido F, Canonica GW. An update on allergen immunotherapy and asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2014;20:109-117.
50. Pfaar O, Gerth van Wijk R. Mite-Allergic Rhinitis: How to Evaluate Clinical Efficacy in Allergen-Specific Immunotherapy Trials? *Curr Treat Options Allergy* 2015;2:1-9.
51. Yukselen A, Kendirli SG. Role of immunotherapy in the treatment of allergic asthma. *World J Clin Cases* 2014;2:859-865.
52. Lu Y, Xu L, Xia M, et al. The efficacy and safety of subcutaneous immunotherapy in mite-sensitized subjects with asthma: a meta-analysis. *Respir Care* 2015;60:269-278.
53. Calatayud CM, García AM, Aragonés AM, et al. Safety and efficacy profile and immunological changes associated with oral immunotherapy for IgE-mediated cow's milk allergy in children: systematic review and meta-analysis. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2014;24:298-307.
54. Passalacqua G. The use of single versus multiple antigens in specific allergen immunotherapy for allergic rhinitis: review of the evidence. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2014;14:20-24.
55. Sato S, Yanagida N, Ogura K, et al. Clinical studies in oral allergen-specific immunotherapy: differences among allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2014;164:1-9.
56. Senti G, von Moos S, Kündig TM. Epicutaneous Immunotherapy for Aeroallergen and Food Allergy. *Curr Treat Options Allergy*. 2013 Dec 17;1:68-78.
57. Jones SM, Burks AW, Dupont C. State of the art on food allergen immunotherapy: oral, sublingual, and epicutaneous. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133:318-323.
58. Rank MA, Bernstein DI. Improving the safety of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2014;2:131-135.
59. Chelladurai Y, Suarez-Cuervo C, Erekosima N, et al. Effectiveness of subcutaneous versus sublingual immunotherapy for the treatment of allergic rhinoconjunctivitis and asthma: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2013;1:361-369.
60. Allam JP, Novak N. Immunological mechanisms of sublingual immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2014;14:564-569.
61. Hofmaier S, Comberati P, Matricardi PM. Immunoglobulin G in IgE-mediated allergy and allergen-specific immunotherapy. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2014;46:6-11.
62. Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat Rev Immunol* 2012;12:821-832.
63. Jutel M, Akdis M, Budak F, et al. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003;33:1205-14.
64. Aydogan M, Mete N, Yazı D, et al. Comparison of Der p1-specific antibody levels in children with allergic airway disease and healthy controls. *Pediatr Allergy Immunol* 2007;18:320-325.
65. Miranda DO, Silva DA, Fernandes JF, et al. Serum and salivary IgE, IgA, and IgG4 antibodies to Dermatophagoides pteronyssinus and its major allergens, Der p1 and Der p2, in allergic and nonallergic children. *Clin Dev Immunol* 2011;2011:302739.
66. Maurer D, Fischer G, Fae I, et al. IgM and IgG but not cytokine secretion is restricted to the CD27+ B lymphocyte subset. *J Immunol* 1992;148:3700-3705.
67. Maurer D, Holter W, Majdic O, et al. CD27 expression by a distinct subpopulation of human B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1990; 20:2679-2684.
68. Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human immunoglobulin (Ig) M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 1998;188:1679-1689.
69. Tangye SG, Liu YJ, Aversa G, Phillips JH, de Vries JE. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J Exp Med* 1998;188:1691-1703.
70. Pauli NT, Henry Dunand CJ, Wilson PC. Exploiting human memory B cell heterogeneity for improved vaccine efficacy. *Front Immunol* 2011;2:77.
71. Rothstein TL, Griffin DO, Holodick NE, et al. Human B-1 cells take the stage. *Ann N Y Acad Sci* 2013;1285:97-114.
72. Zhong X, Gao W, Degauque N, et al. Reciprocal generation of Th1/Th17 and T(reg) cells by B1 and B2 B cells. *Eur J Immunol* 2007; 37: 2400-2404.
73. Wang Y, Rothstein TL. Induction of Th17 cell differentiation by B-1 cells. *Front Immunol* 2012; 3: 281.
74. Deenick EK, Avery DT, Chan A, et al. Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *J Exp Med* 2013;210:2739-2753.