

El efecto del tratamiento anti-IgE en enfermedades inmunomediadas

Cristina Alejandra López Rodríguez

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS DOCTORAL

El efecto del tratamiento anti-IgE en enfermedades inmunomediadas

Departamento de Biología celular, Fisiología e Inmunología

Cristina Alejandra López Rodríguez

Directoras:

Dra. Aina Teniente Serra

Dra. Eva Martínez Cáceres



Porque todo es posible

Porque nunca hay que desistir

Porque todo llega

Por ti papá

Por vosotros familia

ABREVIATURAS

AAS Cuestionario de actividad de angioedema	LAMA Antagonistas de los Receptores Muscarínicos
ACQ Cuestionario de Control de Asma	MBP Proteína Mayor Básica
ADCC Citotoxicidad Dependiente de Anticuerpos	MHC-II Complejo Mayor de
AG-MA Asma leve	miRNA micro RNA
AG-OZB Asma en tratamiento con omalizumab	NK Células Natural Killer
AG-SA Asma severa	NKT Células Natural Killer tipo T
ANAS Anticuerpos Antinucleares	NOS Óxido Nítrico Sintasa
APC Célula Presentadora de Antígeno	PBD Respuesta Broncodilatadora Porstbronquial
ATC Test de Control del Asma	PCR Proteína C Reactiva
BAL Lavado broncoalveolar	PEF Flujo espiratorio máximo
C5aR Receptor de la Anafilotoxina C5a	PGD2 Prostaglandina D2
CTLs Linfocitos T Citotóxicos	PGE2 Prostaglandina E2
DD D Dímero	PPB Partes Por mil Millones
EAACI European Academy of Allergy and Clinical Immunology	PSA Prueba de suero autólogo
Fab Fragmento de unión al antígeno	ROS Especies Reactivas de Oxígeno
Fc Fragmento cristizable	SH2 Inositol fosfatasas con homología 2 de Src
FcεRI Receptor de alta afinidad de la IgE	Syk Tirosina quinasa del bazo
FcεRII Receptor de baja afinidad de la IgE	TAB Test de Activación de Basófilos
FcεRIα Cadena α del receptor de alta afinidad de la IgE	TFG Factor de Crecimiento Tumoral
FcγR Receptores Fc de la familia γ	Tfh Células T Foliculares
FENO Fracción Exhalada de Óxido Nítrico	Tg Tiroglobulina
FEV Volumen Espiratorio Forzado	Th Linfocitos T helper
FEV1 Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo	TPO Tiroperoxidasa tiroidea
FVC Capacidad Vital Forzada	Treg Linfocitos T reguladores
GCI Glucocorticoides	TSH Receptor de tirotropina
GINA Global Initiative for asthma	TSL Linfopoyetina Estromal Tímica
GM-CSF Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	UAS Escala de actividad de la urticaria
HD Controles sanos	UCE Urticaria Crónica Espontanea
Histocompatibilidad tipo II	UCE-NID urticaria crónica espontanea en tratamiento con antihistamínicos
IFN Interferón	UCE-OZB urticaria crónica espontanea en tratamiento con omalizumab
IgE Inmunoglobulina E	UCI Urticaria Crónica Inducible
IL Interleucina	UCT Test de control de urticaria
ILC Célula Linfoide Innata	VEGF Factor de crecimiento Endotelial Vascular
LABA Antagonistas β2 de acción prolongada	VPM Volumen Plaquetario medio
	VSG Velocidad de Sedimentación Globular

INDICE

ABREVIATURAS.....	- 1-
1. RESUMEN.....	- 6-
2. INTRODUCCIÓN	- 8-
2.1 Enfermedades inmunomediadas.....	- 9 -
2.2 Mecanismos de hipersensibilidad	- 9 -
2.2.1 Mecanismo de hipersensibilidad tipo I	- 10 -
2.2.1.1 Estructura de la IgE y sus receptores	- 14 -
2.2.2 Mecanismo de hipersensibilidad de tipo II	- 15 -
2.2.3 Mecanismo de hipersensibilidad tipo III	- 18 -
2.2.4 Mecanismo de hipersensibilidad tipo iv.....	- 19 -
2.3 Urticaria crónica	- 20 -
2.3.1 Urticaria.....	- 20 -
2.3.2 Urticaria crónica	- 21 -
2.3.2.1 Patogenia	- 21 -
2.3.2.2 Inmunofenotipo	- 24 -
2.3.2.3 Epidemiología	- 26 -
2.3.2.4 Diagnóstico clínico	- 26 -
2.3.2.5 Diagnóstico de laboratorio.....	- 27 -
2.3.2.6 Biomarcadores	- 29 -
2.4 Asma	- 33 -
2.4.1 Definición	- 33 -
2.4.2 Epidemiología.....	- 33 -
2.4.3 Etiología.....	- 33 -
2.4.4 Fenotipos y endotipos.....	- 34 -
2.4.5 Diagnóstico clínico.....	- 36 -
2.4.6 Diagnóstico de laboratorio: biomarcadores	- 37 -
2.5 Tratamiento.....	- 38 -
3. HIPÓTESIS.....	- 44-
4. OBJETIVOS.....	- 46-
5. MATERIALES Y MÉTODOS	- 48-
5.1 Diseño del estudio	- 49 -
5.1.1 Justificación del tamaño muestral.....	- 53 -
5.2 Pruebas alérgicas.....	- 54 -
5.3 Muestras biológicas	- 55 -
5.4 Espirometría	- 55 -

5.5 Inmunofenotipado por citometría de flujo	- 55 -
5.5.1 Procedimiento de la tinción de superficie de las muestras de sangre periférica	- 57 -
5.5.2 Procedimiento de conteo con PerfectCount	- 57 -
5.5.3 Adquisición por citometría de flujo.....	- 58 -
5.5.4 Análisis citométrico	- 59 -
5.5.5 Análisis de subpoblaciones tipo T	- 60 -
5.5.6 Análisis de las subpoblaciones T CD4	- 61 -
5.5.7 Análisis funcional: test de activación de basófilos	- 62 -
5.6 Análisis estadístico	- 64 -
6. RESULTADOS.....	- 65-
6.1 Cohorte urticaria crónica.....	- 66 -
6.1.1 Caracterización de los pacientes diagnosticados de Urticaria Crónica	- 66 -
6.1.2 Respuesta a omalizumab y UAS 7 Score.....	- 66 -
6.1.3 Marcadores séricos	- 67 -
6.1.4 Efecto del tratamiento anti-IgE en el sistema inmunológico.....	- 68 -
6.1.4.1 TAB indirecto	- 68 -
6.1.4.2 Caracterización fenotípica de las subpoblaciones tipo T	- 71 -
6.1.5 Omalizumab y sus efectos en las subpoblaciones linfocitarias	- 78 -
6.2 Cohorte Asma Grave	- 81 -
6.2.1 Caracterización de los pacientes diagnosticados de asma	- 81 -
6.2.2 Marcadores séricos	- 81 -
6.2.3 Perfil inmunológico	- 82 -
6.2.4 Caracterización fenotípica de las subpoblaciones T en las cohortes de asma sin tratamiento con anti-IgE en comparación con cohorte asma leve y controles sanos.....	- 88 -
6.2.5 Efecto del tratamiento sobre el sistema inmunitario.....	- 92 -
6.2.5.1 Glucocorticoides.....	- 92 -
6.2.5.2 Omalizumab	- 95 -
7. DISCUSIÓN	- 101-
8. CONCLUSIONES.....	- 115-
9. BIBLIOGRAFIA	- 117-
10. ANEXO I	- 131-

1. RESUMEN

La urticaria crónica y el asma grave alérgica son patologías de alta prevalencia y complejidad inmunológica. Esto puede representar un desafío en la práctica clínica para alcanzar un control adecuado, lo que conlleva a la incorporación de terapias biológicas como el omalizumab. Existen diversos biomarcadores de utilidad para el seguimiento, pronóstico y respuesta terapéutica, pero persisten interrogantes sobre los mecanismos inmunológicos subyacentes asociados al mecanismo de acción de este fármaco, más allá de la inhibición de la IgE.

El objetivo principal de este trabajo fue analizar el efecto del anti-IgE sobre la respuesta adaptativa, con especial atención a las subpoblaciones linfocitarias T. El propósito fue evaluar su potencial como biomarcadores en sangre periférica en pacientes en tratamiento con omalizumab, concretamente en pacientes con urticaria crónica y asma grave alérgica.

Como objetivo complementario, se analizaron distintos parámetros en sangre periférica con el fin de confirmar su utilidad como biomarcadores de seguimiento en pacientes con anti-IgE.

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo de ambas patologías, comparando cohortes en tratamiento con anti-IgE (omalizumab), sin tratamiento y un grupo de controles sanos. El objetivo fue analizar los cambios en las subpoblaciones linfocitarias T y su relación con la acción del fármaco. Para ello, se realizó un inmunofenotipado exhaustivo en sangre total mediante citometría de flujo, incluyendo subpoblaciones de linfocitos naïve, de memoria central, de memoria efectora, efectoras, así como los subtipos Th1, Th2 y Th17. Adicionalmente, en pacientes con urticaria crónica se evaluaron marcadores de inflamación (VSG, DD, PCR), de atopia (prick test y niveles de IgE total) y de autoinmunidad (anticuerpos antitiroideos y test de activación de basófilos indirecto). En los pacientes con asma grave, se analizaron distintos parámetros espirométricos para valorar la función pulmonar (FEV1, FVC).

Los resultados demostraron que el omalizumab induce un perfil de linfocitos T de memoria, restablece el equilibrio entre las subpoblaciones T colaboradoras y contribuye a la normalización de las distintas subpoblaciones linfocitarias. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la monitorización de estas poblaciones podría ser de utilidad como biomarcadores para el diagnóstico y en la predicción de respuesta al tratamiento en aquellos pacientes tratados con anti-IgE.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 ENFERMEDADES INMUNOMEDIADAS

El término Inmunidad deriva de la palabra latina *immunitas*, refiriéndose a la protección frente a procesos legales que disfrutaban los senadores romanos mientras permanecían en el ejercicio de su cargo (1). A partir de entonces, se refirió el término inmunidad a la protección frente a la enfermedad y todas las células y moléculas involucradas que constituyen el sistema inmunitario (1).

Una respuesta inmunitaria insuficiente, causaría daño en nuestro organismo, produciendo distintas enfermedades asociadas a inmunodeficiencias primarias o secundarias, cáncer o infecciones crónicas (2).

Por el contrario, una respuesta excesiva, está relacionada con trastornos como alergias, enfermedades autoinmunes o rechazo en el trasplante (2).

2.2 MECANISMOS DE HIPERSENSIBILIDAD

La reacción de hipersensibilidad se describe como una respuesta inmunitaria excesiva y/o inadecuada frente a antígenos propios o extraños que causa un daño al huésped (3).

Las enfermedades por hipersensibilidad se clasifican en función del tipo de respuesta inmunitaria y de los mecanismos efectores responsables de las lesiones celulares y tisulares. Siguiendo la clasificación que propusieron Gell y Coombs (1963), se pueden clasificar en cuatro tipos (1,3,4) (Tabla 1).

Tabla 1: Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad. Modificado de *Abbas et al* y traducido al español.(1)

Tipo de hipersensibilidad	Mecanismo inmunitario	Mecanismo de lesión tisular/celular
Tipo I/ Inmediata	IgE, linfocitos Th2	Mastocitos, eosinófilos y mediadores (histaminas, leucotrienos)
Tipo II/ Mediada por anticuerpos	IgG o IgM contra antígenos de la superficie celular o matriz extracelular	Opsonización y fagocitosis Activación sistema del complemento Citotoxicidad dependiente de anticuerpos
Tipo III/ Mediada por inmunocomplejos	Inmunocomplejos IgG o IgM	Activación del complemento, C5a, proteasas
Tipo IV/ Retardada	Linfocitos T CD4 ⁺ (Th1, Th17) CTL CD8 ⁺	Citocinas (IFN-γ, entre otros) Muerte directa de célula diana

Ig=Inmunoglobulina; Th= Linfocitos T Helper; IFN= Interferón; CTL= Linfocitos T Citotóxico

Desde inicios del siglo XX, la clasificación de las reacciones de hipersensibilidad propuesta por Gell y Coombs ha evolucionado. *Kroemer y Pichler (2003)*(5) propusieron nuevos subtipos para las reacciones de hipersensibilidad tipo IV, según el tipo de célula T y células efectoras implicadas: IVa involucrando la respuesta tipo Th1 y activación de macrófagos; IVb, asociado a respuesta Th2 y estimulación de eosinófilos; IVc con participación de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) induciendo la apoptosis celular; y IVd, predominante de respuesta Th17 y reclutamiento de neutrófilos.

Fue en el 2018 cuando la *Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI)*, actualizó la clasificación de las reacciones de hipersensibilidad, expandiéndose a un total de nueve tipos. Estos incluyen respuestas mediadas por anticuerpos (I-III), aquellas reguladas por células (IVa-c), mecanismos dependientes de tejidos (V-VI) y reacciones directas a sustancias químicas (VII) (6).

Esta nueva clasificación diferencia las respuestas inmunitarias en tipo 1, tipo 2 y tipo 3, junto con las respuestas mediadas por tejidos. Estas respuestas desempeñan un papel fundamental en diversas enfermedades inmunológicas, incluyendo alergias y trastornos autoinmunes (**Tabla 2**).

2.2.1 MECANISMO DE HIPERSENSIBILIDAD TIPO I

La hipersensibilidad tipo I o Inmediata es aquella mediada por IgE específica frente a distintos alérgenos (7). Este mecanismo de hipersensibilidad es el que se produce en pacientes con reacciones alérgicas, rinoconjuntivitis alérgica, asma, dermatitis atópica, urticaria aguda/angioedema y reacciones alérgicas a alimentos, venenos y drogas (6).

En la reacción de hipersensibilidad de tipo I, la principal célula involucrada es el mastocito, que tiene la capacidad de liberar mediadores inflamatorios durante el proceso de desgranulación. Sin embargo, también intervienen otras células del sistema inmunitario, como los basófilos, macrófagos y eosinófilos. Los alérgenos involucrados en esta reacción de hipersensibilidad de tipo I son: pólenes (árboles, pastos y malezas), ácaros del polvo, caspa de animales, alimentos (por ejemplo, cacahuètes, frutos secos, leche, huevos), látex y medicamentos (por ejemplo, penicilina, antibióticos beta-lactámicos, entre otros) (6).

Este mecanismo de hipersensibilidad consta de dos fases (**Figura 1**):

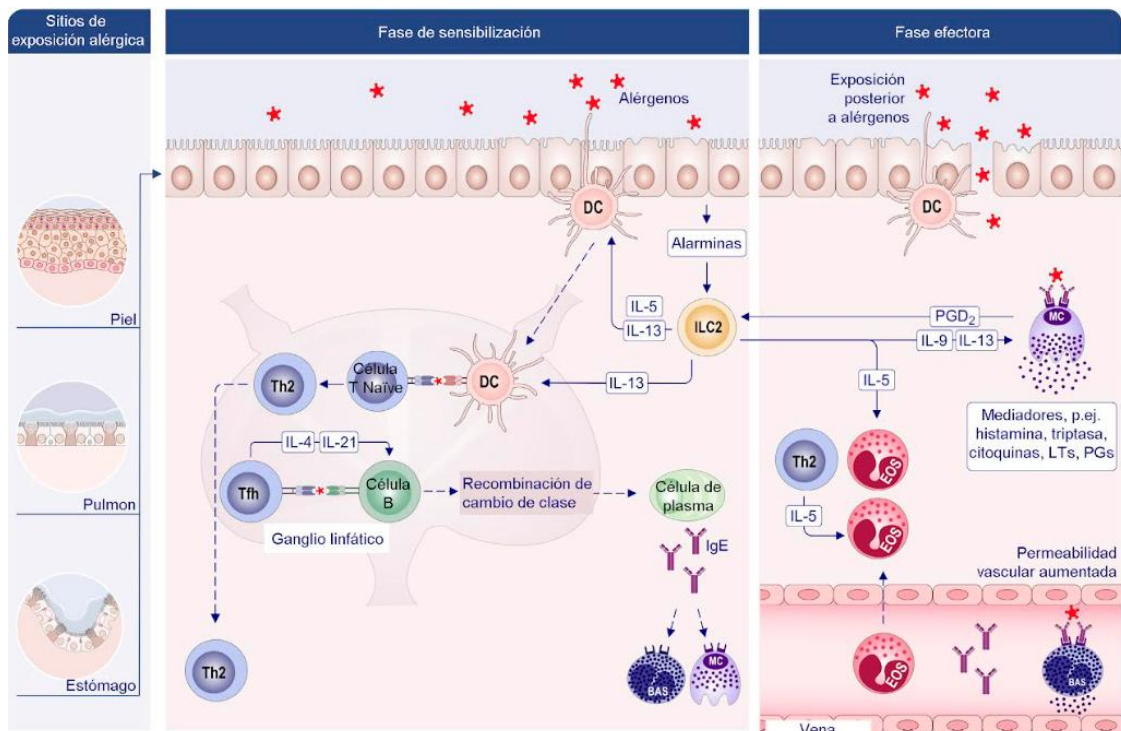


Figura 1: Mecanismo de hipersensibilidad tipo I, Modificado de Jutel et al y traducida al español (6): Consta de una primera fase de sensibilización con el alérgeno, producción de IgE específica y unión a sus receptores en células efectoras, y una fase efectora, que, tras una reexposición con el alérgeno, se entrecruzan las moléculas de IgE adyacentes, dando lugar a desgranulación y liberación de mediadores inflamatorios responsables de la sintomatología de la enfermedad. DC= Célula dendrítica; IL= Interleucina; ILC= célula linfocito innata; Th= Linfocito T helper; Tfh= Linfocito T folicular; PGD₂= Prostaglandina D₂; BAS= Basófilo; MC= Mastocito; EOS= Eosinófilo.

1. Fase de sensibilización e inducción de la memoria:

En un primer contacto con el antígeno, éste es captado por las células presentadoras de antígeno (APC), como las células dendríticas, los linfocitos B y los macrófagos. Estas células procesan y exponen los péptidos del alérgeno en su superficie, unido a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II). Las APC son capaces de secretar metabolitos y citoquinas, promoviendo la activación y diferenciación de los linfocitos T naïve en varias subpoblaciones celulares, como células T helper (Th) (Th1, Th2, Th17), subpoblaciones citotóxicas (Tc), Tc1, Tc2, Tc17 y linfocitos T reguladores (Treg).

La interleucina 4 (IL-4), interleucina clave en el papel alérgico, es producida por macrófagos y basófilos, mientras que las células linfocitos innatas tipo 2 (ILC2) amplifican y mantienen la respuesta alérgica.

Estas células son activadas por citoquinas liberadas por las células epiteliales, como IL-25, IL-33 y TSLP. Una vez activadas, las ILC2 generan citoquinas tipo 2, tales como IL-5, IL-9 e IL-13, las cuales favorecen la respuesta T2, el reclutamiento de eosinófilos y la producción de moco. Este proceso conduce a la diferenciación de los linfocitos T naïve en Th2 y Tc2. A medida que las células Th2 se expanden, comienzan a producir principalmente IL-4 e IL-13, lo que induce un cambio de clase en las inmunoglobulinas hacia IgE y fomenta la proliferación de células B, así como la migración de las células Th2 hacia los tejidos (6).

De igual manera, las citoquinas derivadas de las ILC2 pueden favorecer la reparación local de los tejidos y su remodelación, contribuyendo a la inflamación crónica y al daño tisular en casos de exposición prolongada a alérgenos. Posteriormente, se generan células plasmáticas que sintetizan IgE específica frente al alérgeno, la cual se une de manera estable a receptores de alta afinidad (FcεRI) en células efectoras, como mastocitos y basófilos, sensibilizando así a los mastocitos (4,7).

Por otro lado, los linfocitos T foliculares (Tfh) juegan un papel crucial en el desarrollo y maduración de la respuesta de los linfocitos B, incluyendo la producción de anticuerpos de alta afinidad. Las células Tfh envían señales a las células B en los centros germinales, mediante la liberación de citoquinas como IL-4 e IL-21, y moléculas coestimuladoras como CD40L. Estas señales favorecen el cambio de clase en las células B, lo que resulta en la producción de IgE (4,6,7).

2. Fase de reexposición/efectora:

En un segundo contacto con el alérgeno, se produce el entrecruzamiento de las moléculas de IgE adyacentes en la superficie celular, lo que activa las vías de señalización intracelular e induce la desgranulación de estas células efectoras.

En el proceso de desgranulación, se liberan mediadores ya preformados, como la histamina, heparina, proteasas (por ejemplo, tripsina) y algunas citoquinas, así como mediadores recién generados como prostaglandinas, leucotrienos y nucleótidos de adenosina (6). Estos mediadores causan los síntomas característicos de las enfermedades alérgicas como vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso y producción de moco (6,7).

En este proceso, la IgE produce la sobreexpresión de los receptores FcεRI en los mastocitos, lo que permite que más IgE se una a los receptores y aumente la liberación de los mediadores tras el proceso de entrecruzamiento (6) (**Figura 1**).

Tabla 2: Nueva nomenclatura de las enfermedades alérgicas y reacciones de hipersensibilidad, *Adaptada de EAACI* y traducida al español(6).

REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD								
ALERGIA								
INFLAMACIÓN/MEDIADO POR SISTEMA INMUNOLÓGICO						MECANISMOS DEPENDIENTES DE TEJIDOS		RESPUESTA DIRECTA A SUSTANCIAS QUÍMICAS
MEDIADO POR ANTICUERPOS			MEDIADO POR CÉLULAS					
TIPO I	TIPO II	TIPO III	TIPO IVa (T1)	TIPO IVb (T2)	TIPO IVc (T3)	TIPO V EPITELIAL	TIPO VI METABOLICO	TIPO VII
Linfocitos B: IgE, Th2, ILC2 IL-4, IL-5, IL-8, IL-13 Mastocitos/Basófilos	Linfocitos B: IgM, IgG Fagocitos, neutrófilos Citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC)	Linfocitos B: IgG Inmunocomplejos Complemento, basófilos, mastocitos, plaquetas Fagocitos: neutrófilos, monocitos, macrófagos	Th1: ILC1, Tc1, NK (IFN- γ , TNF- α , granzima B, perforinas)	Th2: ILC2, Tc2, NKT (IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, IL-31) Eosinófilos, linfocitos B, mastocitos	Th17 : ILC3, Tc17 (IL-17, IL-22, IL-23) Neutrófilos	Barrera epitelial dañada, uniones epiteliales debilitadas Células residentes cambiantes (células musculares lisas, glándulas mucosas) Modulación inmunitaria por alarminas: TSLP, IL-25, IL-33	Desregulación inmunitaria inducida por el metabolismo, ácidos grasos de cadena corta y otros metabolitos del microbioma	Respuesta inflamatoria y celular directa por sustancias químicas

Ig= Inmunoglobulina; Th= Linfocitos T helper; ILC= Célula linfoide innata; IL= Interleucina; Tc= Linfocito T citotóxico; NK= célula natural killer; IFN= Interferón; TNF= Factor de necrosis tumoral; NKT= célula natural killer tipo T; TSLP= Linfopoyetina stromal del timo.

2.2.1.1 Estructura de la IgE y sus receptores

- Estructura de la IgE

La inmunoglobulina E fue la última de los 5 tipos de anticuerpos humanos que fue descrita y se asocia comúnmente a varias manifestaciones de las enfermedades alérgicas (8).

La IgE está compuesta por dos cadenas ligeras iguales y una cadena pesada, cada una compuesta por una región variable (V) y una región constante (C). La región constante de la cadena pesada de la IgE contiene cuatro dominios Ig (C ϵ 1-C ϵ 4) y un dominio V (VH). La región constante de la IgE permite que esta se una a sus dos receptores, Fc ϵ RI y Fc ϵ RII (CD23)(8,9) (**Figura 2A**).

- Receptores de la IgE

Los principales receptores estudiados de la IgE son Fc ϵ RI y Fc ϵ RII (CD23).

- ❖ **Fc ϵ RI:** Es un receptor de alta afinidad presente en mastocitos y basófilos, donde se expresa como un tetrámero compuesto por las cadenas $\alpha\beta\gamma_2$.

En otras células, como células presentadoras de antígeno y monocitos, puede expresarse en forma trimérica al perder la cadena β (8)(9).

Debido a su alta afinidad por la IgE, ésta permanece unida al receptor en la superficie celular durante semanas (9). La unión de la IgE se lleva a cabo a través de los dominios tipo inmunoglobulina de la cadena α del receptor (sFc ϵ RI α) (8) (**Figura 2B**).

- ❖ **Fc ϵ RII (CD23):** Es un receptor de baja afinidad expresado en diversas células, como linfocitos B y T, monocitos, células dendríticas foliculares, así como células epiteliales del intestino y células epiteliales respiratorias (9). Es una proteína de membrana tipo II homotrimérica, cuyo dominio C- terminal tipo lectina C, es el sitio de unión de la IgE (9). Este dominio está separado de la membrana por una estructura en forma de tallo compuesta por una triple hélice enrollada en espiral. En humanos, CD23 existe en dos isoformas, CD23a y CD23b, que difieren en seis o siete aminoácidos de la región citoplasmática (**Figura 2C**).

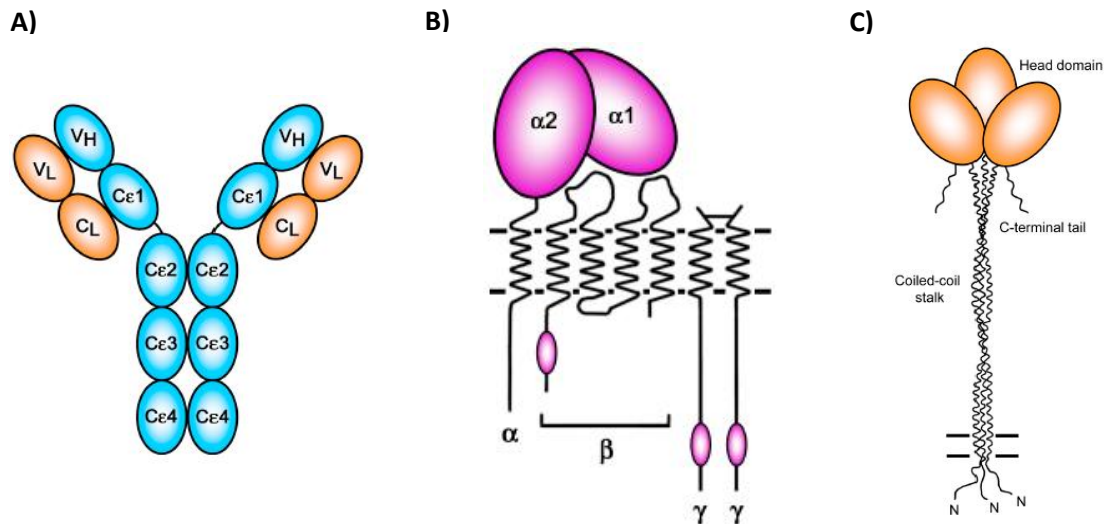


Figura 2: Representación esquemática de la estructura de la inmunoglobulina IgE y sus receptores(8).

(A) Estructura de la IgE, (B) Estructura del receptor FcεRI, (C) Estructura del receptor FcεRII.

2.2.2 MECANISMO DE HIPERSENSIBILIDAD DE TIPO II

El mecanismo de hipersensibilidad de tipo II es una reacción inmunológica mediada por anticuerpos en la que estos (principalmente IgG o IgM) se dirigen contra antígenos presentes en la superficie celular o en la matriz extracelular, lo que provoca la destrucción de células, pérdida de función o daño en los tejidos (10).

Este mecanismo de hipersensibilidad se desarrolla más comúnmente en reacciones inducidas por fármacos (por ejemplo penicilinas y cefalosporinas) aunque también se desencadena en varias enfermedades autoinmunes, entre las cuales se destaca la trombocitopenia inmunitaria, anemia hemolítica autoinmune, la neutropenia autoinmune, anemia perniciosa, enfermedad de Goodpasture (enfermedad mediada por anticuerpos anti-membrana basal glomerular), enfermedad hemolítica del feto y miastenia gravis, entre otras (6). En ambas situaciones, los fármacos como antígenos extrínsecos y los autoanticuerpos como antígenos intrínsecos, se reconocerían como agentes extraños, desencadenándose la respuesta inmunitaria.

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo II están divididas en dos subtipos (3,11):

1. **Tipo IIa:** La hipersensibilidad citotóxica o citolítica, mediada por anticuerpos IgG o IgM, se caracteriza por la generación de anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos en la superficie de células o tejidos.

Esta respuesta inmunológica desencadena citotoxicidad a través de diferentes mecanismos, incluyendo la activación del complemento, la fagocitosis mediada por opsonización y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), lo que puede resultar en destrucción celular y daño tisular.

- a. Citotoxicidad dependiente del complemento: Los inmunocomplejos antígeno-anticuerpo se forman en la superficie de las células, activando la vía clásica del complemento. Esto conduce a la formación del complejo de ataque a la membrana (C5b-C9), provocando la lisis de la célula diana (3,10) (**Figura 3**).
- b. Citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC). Los anticuerpos IgG se unen a antígenos presentes en la célula diana por la región variable (Fab), y por la región constante (Fc) se unen al receptor FcγRIIb, presentes en macrófagos y células natural killer (NK), lo que induce la activación de estos efectores inmunológicos. Como consecuencia, se produce la liberación de moléculas citotóxicas almacenadas en sus gránulos, como perforina y granzima, promoviendo la lisis y apoptosis de la célula diana(3,10) (**Figura 3**).
- c. Unión de anticuerpos a células diana: Los anticuerpos tanto IgG como IgM unidos a la célula diana se unen por sus receptores Fc a fagocitos, activándolos e iniciando el proceso de fagocitosis (3). Durante este mecanismo, los fragmentos del complemento C3b e iC3b, así como los propios anticuerpos, facilitan la captura y eliminación de las células diana por parte de los macrófagos y neutrófilos.
Además, los eosinófilos pueden activarse a través del receptor FcγR, lo que provoca la liberación de mediadores citotóxicos, como la proteína mayor básica (MBP) y las especies reactivas de oxígeno (ROS), contribuyendo al daño celular (6).

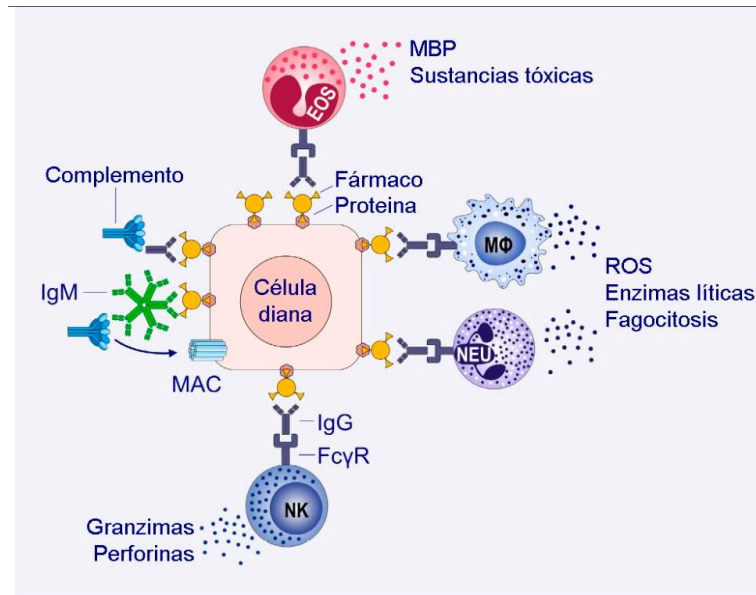


Figura 3: Mecanismos involucrados en las reacciones de hipersensibilidad tipo IIa, *modificado de Jutel et al y traducida al español* (6). Péptidos de fármacos o alérgenos son capaces de unirse a antígenos específicos de la superficie celular, desencadenando la activación del complemento, fagocitosis y/o citotoxicidad dependiente de anticuerpos. MBP= Proteína Básica Mayor; MΦ= Macrófago; ROS= Especies Reactivas de Oxígeno; Ig= Inmunoglobulina; FcγR= Receptor Fc para la inmunoglobulina G; MAC= Complejo de Ataque de Membrana; EOS= Eosinófilo; NEU= Neutrófilo; NK= células NK.

2. **Tipo IIb:** La reacción de tipo IIb se produce cuando los anticuerpos se unen a las células diana, alterando su función sin generar inflamación ni lisis celular. Un ejemplo representativo de este mecanismo es la enfermedad de Graves, en la que los anticuerpos se unen al receptor de la tirotropina (TSH), activándolo de manera anómala y provocando una producción excesiva de hormonas tiroideas (3).

Dentro de este mismo proceso, se ha propuesto que la urticaria crónica autoinmune podría estar mediada por una activación inapropiada de mastocitos y basófilos mediado por anticuerpos IgG, lo que contribuye a la persistencia de la enfermedad (12).

2.2.3 MECANISMO DE HIPERSENSIBILIDAD TIPO III

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo III se caracterizan por la formación de inmunocomplejos entre antígenos solubles y anticuerpos IgG o IgM. Bajo condiciones normales, estos complejos son eliminados eficazmente por el sistema fagocítico mononuclear; sin embargo, cuando la producción de los inmunocomplejos es excesiva o su depuración deficiente, pueden depositarse en distintos tejidos, como en el endotelio vascular, en los glomérulos renales y en los alveolos pulmonares, desencadenando una respuesta inflamatoria (3,6).

La activación del complemento desempeña un papel central en todo este proceso, favoreciendo el reclutamiento de neutrófilos y la liberación de mediadores proinflamatorios, lo que contribuye al daño tisular.

La manifestación clínica depende del sitio de depósito de los inmunocomplejos, pudiendo generar patologías como vasculitis sistémica, glomerulonefritis o artritis inflamatoria. En casos severos, el daño vascular puede evolucionar a necrosis fibrinoide y trombosis, lo que agrava la isquemia y daño tisular (3,6).

Los antígenos responsables pueden ser de origen endógeno, como ocurre en enfermedades autoinmunes como el lupus, o de origen exógeno, como en la enfermedad del suero inducido por fármacos (**Figura 4**).

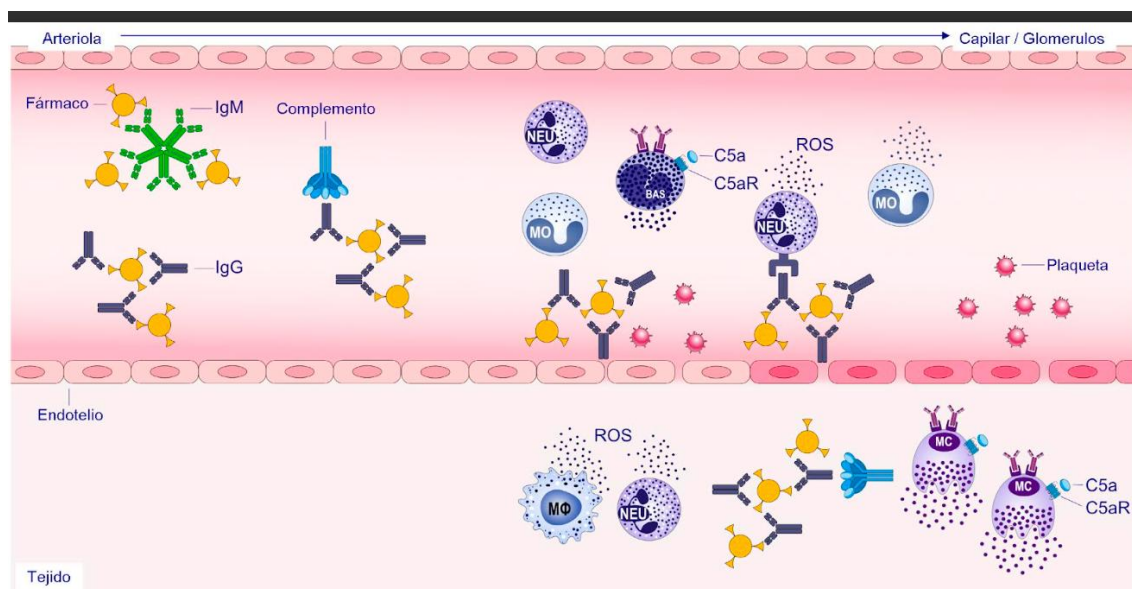


Figura 4: Mecanismo de hipersensibilidad tipo III, modificado de Jutel et al y traducida al español (6): Formación de inmunocomplejos con antígenos endógenos o exógenos, activación del complemento con consecuente desgranulación de las células efectoras y depósito tisular. MΦ= Macrófago; MO= Monocito; BAS= Basófilo; MC= Mastocito; ROS= Especies Reactivas de Oxígeno; Ig= Inmunoglobulina; C5aR= Receptor de la anafilotoxina C5a.

2.2.4 MECANISMO DE HIPERSENSIBILIDAD TIPO IV

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo IV, también conocidas como reacciones retardadas, son mediadas principalmente por células T. Estas reacciones pueden involucrar daño directo por parte de las células T citotóxicas, o la activación de otros leucocitos, como macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, los cuales inducen daño tisular mediante la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y citoquinas proinflamatorias. Siguiendo la clasificación propuesta por *Kroemer y Pichler* (5), las reacciones de hipersensibilidad de tipo IV se pueden dividir en cuatro subtipos (Iva, b, c y d) de acuerdo con sus mecanismos inmunológicos y patogénesis asociada (3,6).

La reacción de tipo IVa está mediada por linfocitos Th1, los cuales activan macrófagos que liberan citoquinas como IFN- γ y TNF- α . Un ejemplo clásico de esta reacción es la dermatitis alérgica de contacto. Por otro lado, las reacciones de tipo IVb son mediadas por células Th2, que producen IL-4, IL-5 e IL-13, causando inflamación eosinofílica e IgE. Un ejemplo de este tipo de reacción es el síndrome de DRESS, donde las células Th2 sensibilizadas provocan daño multiorgánico, y también están involucradas en otras enfermedades atópicas como asma y la rinitis alérgica (3,6).

Las reacciones tipo IVc son mediadas por células T CD8⁺ citotóxicas, que destruyen células diana mediante la liberación de perforinas y otras moléculas citotóxicas, como ocurre en el síndrome de Steven-Johnson. Finalmente, las respuestas tipo IVd están asociadas con la liberación de CXCL-8, que atrae células inflamatorias (como los neutrófilos) y provoca daño tisular, como en la pustulosis exantemática aguda generalizada (AGEP) (3).

En 2018, la EAACI agrupó las reacciones de hipersensibilidad tipo IV en 3 grupos, basado en su presentación clínica y mecanismo inmunológico dominante, excluyendo la reacción tipo IVd específico de neutrófilos (6).

2.3 URTICARIA CRÓNICA

2.3.1 URTICARIA

La urticaria es un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por inflamación cutánea que afecta aproximadamente al 20% de la población mundial (13). Su manifestación principal es la aparición de habones y prurito intenso, a veces acompañado de angioedema, debido a la activación y desgranulación de mastocitos, lo que provoca la liberación de histamina y otros mediadores inflamatorios (13,14).

Se clasifica principalmente según la duración de los síntomas en dos tipos: aguda, cuando los síntomas duran menos de 6 semanas, y crónica, si persisten más allá de las 6 semanas. La mayoría de los casos corresponden a urticaria aguda, la cual suele asociarse a infecciones, medicamentos o alimentos.

Además de la clasificación por duración, la urticaria también puede dividirse según sus desencadenantes en dos grandes grupos: urticaria espontánea, cuando no se identifica un factor específico que la provoque, y urticaria inducible, cuando los síntomas aparecen tras la exposición a estímulos físicos o específicos (13,15).

En la práctica clínica, el término urticaria crónica incluye tanto la urticaria crónica espontánea (UCE) como la urticaria crónica inducible (UCI), dado que en ambos casos los síntomas persisten durante un periodo superior a seis semanas.

La mayoría de las urticarias inducibles que se mantienen en el tiempo suelen clasificarse como crónicas, debido a su relación con estímulos físicos recurrentes. Por el contrario, la urticaria aguda inducible es menos frecuente, y habitualmente, se autolimita tras la supresión del estímulo desencadenante (16,17) (**Tabla 3**).

Tabla 3: Clasificación de urticarias y las pruebas diagnósticas recomendadas. Adaptado de *The International EAACI/GA²LEN/EuroGuiDerm/APAAACI guideline for the definition, classification, diagnosis, and management of urticaria* y traducida al español(18).

Tipos	Subtipos	Pruebas diagnósticas de rutina
Urticaria Espontánea	Urticaria espontánea aguda	Ninguna
	Urticaria espontánea crónica	Hemograma, VSG, PCR, IgG anti-TPO o IgE total
Urticaria Inducible	Urticaria por frío (<i>a frigore</i>)	Test de provocación al frío
	Urticaria por presión	Test de provocación con presión
	Urticaria solar	Test con luz UV o luz visible a diferentes longitudes de onda
	Urticaria por calor	Test de provocación con calor
	Dermografismo	Puede realizarse mediante estímulo mecánico simple
	Angioedema vibratorio	Test de provocación con vibración
	Urticaria acuagénica	Test de provocación con agua
	Urticaria colinérgica	Test de provocación mediante ejercicio o aumento de temperatura corporal
	Urticaria de contacto	Test de exposición controlada al contacto sospechoso

VSG= Velocidad de sedimentación globular; PCR= Proteína C Reactiva; TPO: Tiroperoxidasa tiroidea.

2.3.2 URTICARIA CRÓNICA

2.3.2.1 Patogenia

La UCE se caracteriza por la presencia recurrente de habones y, en algunos casos, angioedema, con una duración mínima de seis semanas y que, en ciertos pacientes, pueden prolongarse durante meses o incluso años (19). Esta condición es más prevalente en adultos que en niños, con una mayor frecuencia en mujeres (20).

Aunque su etiología no está completamente establecida, se ha propuesto un posible mecanismo autoinmunitario, respaldado por su asociación con otras enfermedades autoinmunes, como la tiroiditis de Hashimoto y la diabetes tipo 1. Además, se ha descrito un aumento en la producción de anticuerpos anti-peroxidasa tiroidea (TPO) y anti-tiroglobulina (Tg) en pacientes con UCE (21).

Aunque existe cierta controversia acerca del mecanismo patogénico de la enfermedad, se han descrito distintas teorías que podrían explicarlo (**Figura 5**):

A) *El mastocito como desencadenante de la enfermedad:* La formación de habones y angioedema en UCE está asociado con la activación de los mastocitos en la piel, los cuales liberan mediadores inflamatorios (22).

Existen ciertos agentes que pueden contribuir a la estimulación de los mastocitos para una posterior desgranulación como el estrés, algunos fármacos, infecciones virales, bacterianas o parasitarias, entre otros (23).

La activación del mastocito puede ocurrir mediante mecanismos dependientes o independientes de IgE. La estimulación IgE-dependiente provoca la desgranulación de los mastocitos, pero existen otros agentes como sustancias polibásicas (a través del receptor MrgX2), neuropéptidos (sustancia P, péptido intestinal vasoactivo, somatostatina), péptidos del complemento (C5a vía receptor CD88/C5aR) y opiáceos que contribuyen a la activación del mastocito vía independiente de IgE (23).

Esta activación mastocitaria desencadena un proceso inflamatorio que propicia la infiltración en la piel de varias células inmunitarias, tales como linfocitos T, basófilos y eosinófilos, contribuyendo al desarrollo de la patogenia y síntomas de la enfermedad (22,24–26).

B) *UCE como enfermedad autoinmunitaria:* Como se mencionó previamente, en la UCE intervienen mecanismos de hipersensibilidad tipo I y tipo IIb (3,21,22).

A diferencia de la hipersensibilidad tipo I clásica, la UCE tipo I se caracteriza por la presencia de anticuerpos IgE dirigidos a autoantígenos (también llamados autoalérgenos), lo que da lugar a la UCE autoalérgica (22). En este endotipo, lo fundamental es la presencia de un autoantígeno en la piel, el cual es capaz de formar un complejo con IgE y activar los mastocitos (27). Se ha reportado que algunos pacientes desarrollan autoanticuerpos IgE dirigidos contra la IL-24 y TPO (27). La IL-24 se encuentra elevada en pacientes con UCE y está asociada a diversas enfermedades autoinmunes e inflamación cutánea, siendo detectada en las lesiones dérmicas de pacientes con UCE (28,29). De manera similar, los pacientes con UCE muestran reactividad en el prick test frente a TPO (27).

Por otro lado, la hipersensibilidad tipo IIb se distingue por un mecanismo dependiente de autoanticuerpos IgG, dando lugar a una activación inapropiada de mastocitos y basófilos. Se identifican dos mecanismos principales de activación:

1. Defectos en las señales intracelulares: Alteraciones en la tirosina quinasa del bazo (SYK) o en la inhibición de reguladores negativos como el inositol fosfatasas con homología 2 de Src (SH2) (SHIP), que favorecen desgranulación espontánea de mastocitos o basófilos (20,30,31).

2. Activación de mastocitos o basófilos mediado por anticuerpos: Los anticuerpos, principalmente IgG, aunque también se han descrito casos de IgM, se dirigen contra la porción Fc de la IgE o de su receptor de alta afinidad, FcεRI, en las células efectoras, lo que induce la desgranulación espontánea (27).

Las subclases de anticuerpos IgG1 e IgG3 son las más implicadas (27). Además, estos anticuerpos activan el complemento, generando la anafilotoxina C5a que se une a su receptor en mastocitos y basófilos, aumentando la liberación de histamina (27). Esta activación puede derivar de la escisión directa del C5 a través de enzimas de coagulación como el factor Xa, iniciando la liberación de histamina a través de la unión de C5a al C5aR (21,27,32).

El mecanismo exacto de la desregulación inmune que genera la producción de autoanticuerpos sigue siendo desconocido, lo que dificulta la diferenciación entre ambos tipos de UCE.

Algunos estudios indican que los pacientes con UCE tipo IIb, presentan niveles más bajos de IgE y elevados de IgG anti-TPO (27,33), y tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes asociadas como tiroiditis de Hashimoto o vitíligo (27,34). El diagnóstico de la UCE tipo IIb se confirma mediante una prueba de suero autólogo (PSA) positiva, junto con la reactividad en el test de activación de basófilos (TAB) y la presencia de anticuerpos IgG dirigidos contra la IgE o contra su receptor en suero (35) (**Figura 5**).

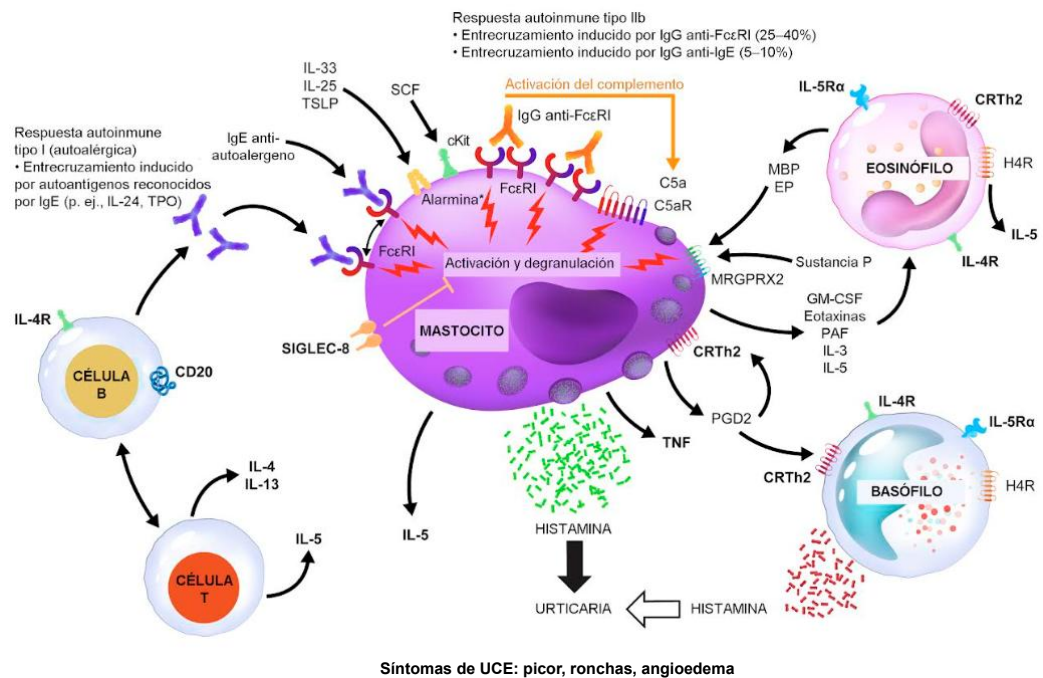


Figura 5: Mecanismos inmunológicos implicados en la urticaria crónica, modificado de Kaplan et al y traducida al español(27). La activación y desgranulación de los mastocitos puede inducirse por una respuesta autoinmune tipo I (autoalérgica) mediada por IgE o tipo IIb (mediada por IgG contra FcεRI o IgE), desencadenando la liberación de mediadores inflamatorios como la histamina contribuyendo a los síntomas de la enfermedad: picazón, ronchas y angioedema. UCE= Urticaria crónica espontánea; TPO= Tiroperoxidasa tiroidea; IL= Interleucina; Ig= Inmunoglobulina; FcεRI= Receptor de alta afinidad para la IgE; IL-4R= Receptor de la IL-4; IL-5R= Receptor de la IL-5; C5aR= Receptor de la anafilotoxina C5a; H4R= Receptor de la histamina tipo 4; CRTh2= Molécula homóloga al receptor de quimioatrayentes expresada en linfocitos Th2; TNF= Factor de necrosis tumoral; PGD2= Prostaglandina D2; GM-CSF= Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; PAF= Factor activador de plaquetas; MRGPRX2= Receptor acoplado a proteína G X2; MBP= Proteína básica mayor; EP= Peroxidasa del eosinófilo;; SCF= Factor estimulante de células madre; TSLP= Linfopoyetina estromal tímica.

2.3.2.2 Inmunofenotipo

Los pacientes con UCE presentan un infiltrado perivascular alrededor de pequeñas venas, donde predominan los linfocitos T CD4⁺, acompañados por neutrófilos, mastocitos, basófilos y eosinófilos (36). Además, muestran un perfil proinflamatorio reflejado en niveles elevados de diversas citoquinas como IL-6, IFN-γ y TNF-α en suero, lo que evidencia que no se trata de una enfermedad limitada a la piel (36).

Por otro lado, se ha observado niveles elevados de citoquinas en sangre como IL-31, IL-33 e IL-25. Se ha descrito que los pacientes con UCE presentan, además, concentraciones elevadas de IL-31 en plasma, lo que se asocia al prurito característico de la enfermedad. Aunque los linfocitos Th2 son la principal fuente de IL-31, también se libera por mastocitos y basófilos, mediante un mecanismo dependiente de IgE. Este mecanismo dependiente de IgE favorece la unión de la IgE a su receptor FcεRI en mastocitos y basófilos, activándolos y desencadenando la liberación de la IL-31. Posteriormente, la IL-31 se puede unir a sus receptores IL-31RA presentes en basófilos, induciendo la liberación de citoquinas tipo Th2 (IL-4 o IL-13) (29,37).

La IL-33 se expresa de manera local en la piel inflamada, encontrándose en queratinocitos y mastocitos. Esta citoquina actúa como una señal de alarma para el sistema inmunitario en caso de lesiones en el tejido, contribuyendo así a la inducción de la inflamación tipo perfil Th2 (36–39).

La IL-25, se expresa en células epiteliales, mastocitos y eosinófilos involucrados en la urticaria. Ésta se libera de manera dependiente de IgE, estimulando la respuesta tipo Th2 (29,40,41).

En relación con el perfil inmunológico, los pacientes con UCE no muestran un perfil concreto (42). Autores como *Ferrer et al* (42) analizaron si los pacientes con UCE presentaban un perfil inmunológico predominante Th1 o Th2. Sus hallazgos revelaron niveles elevados de IL-4, característica del perfil Th2, en comparación con IFN-γ, asociado a perfil Th1. Además, demostraron que los linfocitos T CD4⁺ en estos pacientes se encuentran activados y liberan grandes cantidades de citoquinas incluso en ausencia de un estímulo específico (42). Estos hallazgos han sido confirmados por otros estudios a través de análisis de biopsias cutáneas (36).

Por otro lado, *Huilan et al* (43) quisieron estudiar el perfil inmunológico de pacientes con UCE y su relación con los niveles de IgE. Los resultados indicaron que estos pacientes presentaban un aumento de las células NK, así como una relación CD4⁺/CD8⁺ elevada, atribuida a una disminución en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺. Este hallazgo sugiere una posible similitud entre la UCE y los procesos infecciosos de origen viral (43).

Respecto a los linfocitos B, se observó una mayor proliferación, junto con una reducción de la apoptosis, relacionándose con niveles disminuidos de IL-15 e IL-21. Ambas citoquinas participan de forma directa en la regulación de la supervivencia y diferenciación de los linfocitos B: IL-15 favorece su proliferación y resistencia a la apoptosis, mientras que IL-21

modula su activación y su paso a células de memoria o plasmáticas. La disminución simultánea de ambas citoquinas puede, por tanto, alterar estos mecanismos de control y contribuir a la expansión observada. Además, esta alteración favorece un aumento en la expresión de IgE por parte de los linfocitos B (43,44).

Por último, *Chen et al* (45) demostraron la complejidad del perfil inmunitario de los pacientes con UCE, observándose niveles más elevados en plasma de citocinas relacionadas con los perfiles Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-10, IL-13) y Th17 (IL-17) asociándose con una mayor severidad de la enfermedad (45).

2.3.2.3 Epidemiología

La UCE afecta alrededor del 1% de la población mundial en todas las edades, mayoritariamente a mujeres jóvenes y de mediana edad. En el caso de la UCE con angioedema aislado, se desconoce la prevalencia real, pero se considera que representa aproximadamente el 10% de los casos de UCE (46).

2.3.2.4 Diagnóstico clínico

Un diagnóstico adecuado de la UCE requiere la historia clínica detallada de cada paciente y un examen físico para identificar lesiones cutáneas como habones y angioedema.

Para identificar el endotipo de la enfermedad, se recomiendan pruebas de laboratorio como la determinación de IgE (indicador de UCE tipo I) y la detección de anticuerpos IgG contra la TPO (asociada a UCE tipo IIb) (14).

Según la guía de la **Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI)** (14), la evaluación diagnóstica de la urticaria tiene como objetivos: confirmar el diagnóstico y descartar diagnósticos diferenciales; identificar causas subyacentes, detectar condiciones que modifiquen la actividad de la enfermedad; evaluar comorbilidades; identificar las consecuencias de la UCE; valorar predictores del curso clínico y de la respuesta al tratamiento; y monitorizar la actividad, el impacto y el control de la enfermedad (14).

Con el fin de monitorizar la actividad, el impacto y el control de la enfermedad, existen cuestionarios como el cuestionario de actividad de la urticaria (*Urticaria Activity Score (UAS)*), el cuestionario de actividad del angioedema (*Angioedema Activity Score (AAS)*) y el test de

control de urticaria (*Urticaria Control Test*), útiles para evaluar la actividad y realizar el seguimiento de la enfermedad:

- Urticaria Activity Score (UAS): Es un cuestionario utilizado para evaluar la actividad de la enfermedad que clasifica los habones y el prurito en diferentes niveles de intensidad. Se asigna una puntuación que varía de 0 (sin síntomas) a 3 (síntomas intensos) durante una semana, con un máximo de 42 puntos (14,47).
- Angioedema Activity Score (AAS): Es un cuestionario que consta de 5 preguntas con 4 opciones de respuesta, que se puntúan de 0 a 3. La puntuación total puede variar de 0 a 15 por días, donde las puntuaciones más bajas indican una actividad de la enfermedad baja y las más altas reflejan una actividad alta (14).
- Urticaria Control Test (UCT): Esta herramienta ayuda a monitorizar el control de la enfermedad, evaluando el grado de manejo que tiene el paciente sobre sus síntomas. El cuestionario incluye 4 preguntas relacionadas con la sintomatología, la calidad de vida del paciente y la eficacia del tratamiento (48).

2.3.2.5 Diagnóstico de laboratorio

Para el screening inicial de la UCE, se recomienda realizar un recuento sanguíneo diferencial, determinar la velocidad de sedimentación globular (VSG), el D-Dímero (DD), y la proteína C reactiva (PCR). Estas pruebas permiten identificar causas subyacentes, como neoplasias malignas, enfermedades autoinmunitarias, endocrinas, infecciosas o tiroideas (49).

Para diferenciar los dos tipos de UCE, en la variante tipo I o autoalérgica, es útil medir los niveles de anticuerpos IgE totales y los anticuerpos IgE contra la TPO, ya que los pacientes con esta condición suelen presentar niveles elevados de IgE anti-TPO (27).

Para la UCE tipo IIb, se recomienda realizar un screening inicial de anticuerpos antinucleares (ANAS) para descartar cualquier otra enfermedad autoinmunitaria, así como la medición de anticuerpos IgG anti-TPO y los niveles de complemento C3, C4 y C5a (50).

Además, se puede realizar la prueba de suero autólogo (PSA), la cual detecta la presencia de autoanticuerpos funcionales circulantes dirigidos contra FcεRIα o la IgE. Esta prueba tiene una sensibilidad del 70% y especificidad del 80% (35).

Un resultado positivo del PSA se ha asociado con enfermedad tiroidea autoinmunitaria, un curso más prolongado de la enfermedad y una menor respuesta al tratamiento (51). Para obtener resultados precisos, es importante que los pacientes suspendan los antihistamínicos cinco días y las corticoides dos semanas antes de la prueba. El

procedimiento consiste en extraer muestra venosa e inyectar 50 µL de suero del propio paciente. La lectura del resultado se realiza a los 30 minutos y se considera positiva si el habón generado es ≥ 1.5 mm mayor que el del control (51).

Se está investigando la utilidad de nuevas pruebas complementarias a la PSA, como el test de activación de basófilos (TAB) indirecto (52,53).

Los basófilos, que representan menos del 1% de los leucocitos circulantes, tienen una estructura similar a los mastocitos y expresan en su superficie el receptor de alta afinidad para la IgE. Su activación conlleva la liberación de gránulos preformados, así como la secreción de citoquinas y otros mediadores (54). Además, durante este proceso, los basófilos regulan la expresión de ciertos marcadores que se encuentran en su membrana.

Knol et al (55) demostraron que el marcador de superficie CD63 se expresa en basófilos desgranulados y que su detección es posible mediante citometría de flujo, gracias a la fusión de los gránulos secretorios con CD63 (54,56).

El TAB es una prueba útil en el diagnóstico de enfermedades alérgicas mediadas por IgE, como las reacciones a alimentos y fármacos, y actualmente se está evaluando su aplicación en el diagnóstico de UCE (54). A pesar de su utilidad, el TAB directo no es adecuado para el diagnóstico de UCE, ya que los basófilos circulantes de estos pacientes presentan una liberación de histamina reducida debido a su desensibilización in vivo (57–59). Por este motivo, se recurre al TAB indirecto (57). Este ensayo consiste en exponer in vitro el suero del paciente a basófilos de un individuo control para evaluar si induce su activación. Un resultado positivo indicaría la presencia de anticuerpos en el suero del paciente contra la IgE o su receptor (57) (**Figura 6**).

Este TAB indirecto permite identificar un fenotipo de urticaria crónica espontánea autoinmune con mayor actividad de la enfermedad. Los resultados positivos se asocian con niveles bajos de IgE total, y en algunos casos, con basopenia, eosinopenia y angioedema, indicando una forma más activa de la enfermedad y peor respuesta al tratamiento (60,61).

Este método se presenta como una herramienta prometedora para el diagnóstico de UCE. No obstante, su rendimiento diagnóstico varía significativamente según el procedimiento utilizado para la preparación de los basófilos del donante. Factores como la elección de basófilos de individuos no atópicos o tópicos, y la selección de los marcadores a utilizar influyen en su precisión. Entre los marcadores de identificación, destaca el CCR3 o CD123, mientras que el CD63 o CD203c son empleados como marcadores de activación (57).

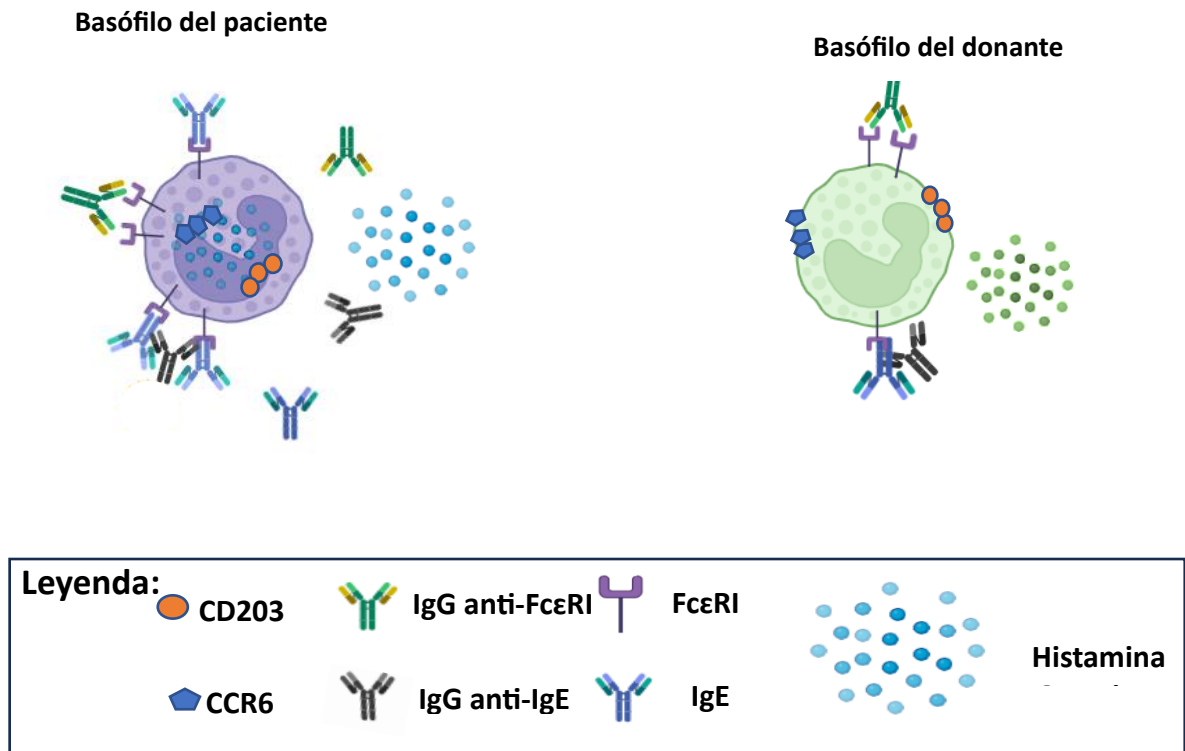


Figura 6: TAB indirecto. El suero del paciente contiene basófilos activados y desgranulados, así como anticuerpos IgG anti-receptor FcεRI o anti-IgE, capaces de inducir in vitro la desgranulación de los basófilos del donante, detectada mediante los marcadores de identificación CCR3 y de activación CD203c.

Fuente: elaboración propia. Ig= Inmunoglobulina; FcεRI= Receptor de alta afinidad para la IgE.

2.3.2.6 Biomarcadores

La UCE presenta una gran variabilidad en su expresión clínica, lo que dificulta la identificación de biomarcadores específicos. Sin embargo, diversos estudios han identificado factores clínicos y hallazgos de laboratorio que se pueden relacionar con una mayor severidad o actividad de la enfermedad.

❖ **Características clínicas asociadas a mayor severidad de la enfermedad**

1. Edad e inicio de la enfermedad: Se ha observado que una edad más avanzada al inicio de la enfermedad puede asociarse con una mayor severidad (62,63).
2. Sexo: La UCE es más prevalente en mujeres, quienes presentan un mayor riesgo de desarrollar formas más severas de la enfermedad (62,64,65).
3. Duración de la enfermedad: Estudios indican que una mayor duración de la enfermedad se asocia con una mayor severidad del cuadro clínico (62,63).
4. Angioedema: La presencia de angioedema se considera un marcador de gravedad de la enfermedad (62,66).
5. Hipersensibilidad a medicamentos antiinflamatorios no esteroideos: Entre el 10-25% de los pacientes con UCE presentan exacerbaciones de la enfermedad tras la ingesta de AINES. Esta hipersensibilidad se ha relacionado con la presencia de anticuerpos IgE contra TPO (62,67).
6. Respuesta a antihistamínicos: Los pacientes que presentan resistencia al tratamiento con antihistamínicos suelen desarrollar una mayor severidad de la enfermedad en comparación con aquellos que responden adecuadamente al tratamiento (62,68),
7. Test de suero autólogo (PSA): Diversos estudios han corroborado la utilidad del test de suero autólogo en pacientes con UCE, demostrando que aquellos con una respuesta positiva a la inyección de su propio suero tienen a presentar una enfermedad más activa dando lugar a habones y erupciones (62,69,70).

❖ **Hallazgos de laboratorio relacionados con mayor severidad o actividad de la UCE**

Se han identificado diversos parámetros serológicos relacionados con el seguimiento y pronóstico de la UCE; algunos ya incorporados en la práctica clínica, mientras que otros se encuentran en fase de investigación, actuando como biomarcadores útiles en la enfermedad (Tabla 4).

Biomarcadores incorporados en la práctica clínica:

1. Marcadores proinflamatorios (PCR, D-Dímero): Múltiples investigaciones han demostrado que pacientes con una enfermedad más severa presentan niveles elevados de PCR y DD. *Kolkhir et al* corroboraron estos resultados, demostrando que formas más severas de la enfermedad se correlacionaba con niveles elevados de PCR y test de suero autólogo positivo (71,72).

2. Recuento de eosinófilos: El recuento de eosinófilos en sangre se relaciona inversamente con la actividad de la enfermedad, ya que estas células migran hacia la piel (62,73). Además, niveles elevados de eotaxina, una citocina quimiotáctica de eosinófilos, se han asociado con una mayor gravedad de la UCE (62,74).
3. Vitamina D: Los niveles de vitamina D muestran una relación inversa con la severidad y duración de la enfermedad, sugiriendo un posible papel en la modulación de la inflamación en la UCE (62,75,76).
4. Anticuerpos antitiroideos Existen hallazgos en la literatura que han demostrado la relación entre la UCE y otras enfermedades autoinmunitarias, especialmente la tiroiditis autoinmune. La coexistencia de ambas condiciones se ha vinculado con una mayor duración de la enfermedad, respaldando una posible patogénesis autoinmunitaria en la UCE (62,77).
5. Test de activación de basófilos (TAB): Un resultado positivo de TAB se ha relacionado con una enfermedad más activa, lo que lo convierte en un biomarcador potencial para identificar pacientes con formas más severas de UCE (62,78).
6. Anticuerpos antinucleares (ANA): Determinados estudios han reportado la presencia de ANAs en pacientes con UCE. En la práctica clínica, el screening de estos anticuerpos puede ser útil para identificar comorbilidades en pacientes diagnosticados con UCE (79).

Biomarcadores en investigación:

1. Volumen plaquetario medio (VPM): Ciertas teorías sugieren que un VPM elevado está relacionado con una mayor severidad de la enfermedad (62,80,81).
2. Recuento de basófilos: Junto con los mastocitos, los basófilos desempeñan un papel clave en la patogénesis de la UCE. Su número en sangre se correlaciona con la actividad de la enfermedad, ya que migran desde los vasos sanguíneos hacia la piel. Un número bajo de basófilos (basopenia) se ha asociado con una enfermedad más activa y mayor puntuación de la actividad de la urticaria (UAS). Sin embargo, este marcador aún no se ha implementado en la práctica clínica debido a la falta de evidencia (62,82).
3. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF): Este factor es un mediador clave de la permeabilidad vascular. Se ha observado que niveles elevados de VEGF se correlaciona con una UCE más severa (62,83).
4. Citoquinas
 - a. Proinflamatorias (IL-6 e IL-8): La elevación de interleucinas proinflamatorias como la IL-6 y la IL-8, se ha asociado con una mayor severidad de la UCE (71,72). Se ha propuesto que la sobreactivación de la

vía de señalización de la IL-6 contribuye a una inflamación crónica, perpetuando la enfermedad (62,84,85).

- b. Asociadas a perfil Th2: En biopsias de pacientes con UCE, se han identificado niveles elevados de citoquinas asociadas a respuestas tipo Th2, incluyendo IL-4, IL-5, así como las alarminas epiteliales IL-33, IL-25 y TSLP(86). De forma concordante, estudios séricos también han demostrado un aumento significativo de IL-4, lo que sugiere activación de linfocitos T CD4 con polarización Th2, sin detectarse incrementos en IFN- γ , marcador característico del perfil Th1(87).

5. Subpoblaciones celulares: La frecuencia de los linfocitos Th17 se ha correlacionado positivamente con la severidad clínica de la enfermedad, mientras que los pacientes con UCE presentan porcentajes reducidos de linfocitos T reguladores, indicando un desequilibrio inmunológico que podría contribuir a la persistencia de la inflamación(88).

Estos hallazgos permiten contextualizar la caracterización de las subpoblaciones celulares presentes en sangre en el marco inmunológico descrito en la UCE.

Tabla 4: Biomarcadores serológicos de severidad utilizados en la práctica clínica en pacientes diagnosticados de urticaria crónica espontánea (UCE). Adaptado de *Riccardo Asero & Massimo Cugno y traducida al español*(62).

Biomarcador	Niveles en la UCE SEVERA
PCR	Elevada
Recuento de eosinófilos	Bajo
D- dímero	Elevado
Vitamina D	Baja
Anticuerpos anti-TPO	Elevado
TAB	Positivo
ANAS	Positivo

PCR= proteína C reactiva; TAB= Test de activación de basófilos; ANAS= Anticuerpos antinucleares

2.4 ASMA

2.4.1 DEFINICIÓN

El asma es una enfermedad heterogénea caracterizada por la inflamación de las vías respiratorias, manifestándose con sibilancias, dificultad respiratoria, opresión torácica y tos. Esta sintomatología está asociada a una obstrucción variable del flujo aéreo (89).

La obstrucción bronquial del flujo y los síntomas pueden resolverse de manera espontánea o con tratamiento, y en ocasiones, la enfermedad puede permanecer ausente durante semanas o meses (89). Afecta alrededor de 300 millones de personas en todo el mundo, sin distinción de edad y/o grupo étnico (89,90).

2.4.2 EPIDEMIOLOGÍA

Según el Organismo Mundial de la Salud (OMS), la enfermedad asmática es una de las principales enfermedades no transmisibles que afecta tanto a niños como a adultos y es la enfermedad crónica más frecuente entre la población infantil. Se estima que afecta a unos 262 millones de personas y causó 455000 muertes en 2019 (91).

2.4.3 ETIOLOGÍA

El asma es una enfermedad multifactorial influenciada por el estilo de vida, factores medioambientales, predisposición genética y comorbilidades, entre otros (92). La probabilidad de desarrollar la enfermedad asmática incrementa significativamente en individuos con antecedentes familiares, especialmente en familiares cercanos como padres o hermanos. Del mismo modo, antecedentes de atopía como rinitis o eccema constituyen un factor de riesgo relevante para su desarrollo. A su vez, el estilo de vida de entornos urbanos se relaciona con una mayor prevalencia de asma, debido a la exposición a contaminantes ambientales y otros factores relacionados con el estilo de vida (93).

Por otro lado, el desarrollo pulmonar durante los primeros años de vida es un factor clave, y ciertos acontecimientos que afecten a este proceso pueden predisponer a enfermedad asmática.

Entre ellos se encuentra el bajo peso al nacer, la prematuridad, la exposición al humo del tabaco y otras fuentes de contaminación atmosférica, así como infecciones víricas.

Asimismo, se considera que la exposición a diversos tipos de alérgenos e irritantes ambientales incrementa el riesgo de asma, incluyendo la contaminación del aire interior y exterior, los ácaros del polvo, el moho y la exposición laboral a sustancias químicas, humos o polvo (93). Por último, niños y adultos con sobrepeso u obesidad tienen más riesgo de padecer asma.

2.4.4 FENOTIPOS Y ENDOTIPOS

La enfermedad asmática es una enfermedad compleja que durante años se ha debatido sobre la posibilidad de que se tratara de una sola entidad con varias presentaciones clínicas o si engloba varias enfermedades con una presentación clínica similar (94).

Fue *Wenzel* en 2006 (95), quien propuso que los pacientes asmáticos presentan distintos fenotipos según el proceso de la enfermedad. Por tanto, el asma engloba muchas variantes de la enfermedad con distintas etiologías y/o fisiopatologías (94,95).

El **fenotipo** del asma se refiere a las características observables, incluyendo características clínicas, bioquímicas y fisiológicas (94). El **endotipo**, en cambio, clasifica diferentes subtipos de asma según mecanismos moleculares o respuesta terapéutica (96). Dado la heterogeneidad genética del asma, coexisten múltiples endotipos, cada uno asociado a distintas características clínicas, diferentes mecanismos patogénicos y respuestas terapéuticas específicas (96).

A continuación, se muestra una tabla resumen de la clasificación de los fenotipos de asma según *Wenzel* (**Tabla 5**).

La clasificación del asma por endotipos se basa en los mecanismos moleculares y celulares implicados en su patogenia (**Tabla 6**)(97).

Tabla 5: Clasificación de los fenotipos de asma, adaptado de la clasificación de *Wenzel* y traducida al español (95).

Grupo	Fenotipo	Descripción resumida
Clínicos/fisiológicos	Por gravedad	Clasificado en leve, moderado y grave según la GINA (98).
	Propenso a exacerbaciones	Factores asociados: FEV1 bajo, inicio temprano, ascendencia africana, AINES (89,95).
	Con obstrucción fija	Restricción crónica al flujo aéreo, con síntomas persistentes o exacerbaciones frecuentes (89,95).
	Edad de inicio	Inicio temprano (< 12 años): más homogéneo, asociado a atopía. Inicio en edad adulta: más heterogéneo, peor función pulmonar (95,99).
	Resistencia a corticoides	Falta de respuesta al tratamiento; posible implicación de alteraciones epigenéticas e inflamación no eosinofílica (95,100,101).
Por desencadenantes	Inducido por medicamentos (AINES)	Asociado a alteraciones en la síntesis de leucotrienos e IL-5 (95).
	Asma alérgica	Mediado por IgE y Th2, común en niños y adultos con antecedentes familiares (95).
	Asma ocupacional	Asociada a exposición laboral; mecanismos inmunológicos y no inmunológicos (95).
	Inducido por ejercicio	Broncoespasmo post-ejercicio por mecanismos inflamatorios y vasoconstrictores (95).
	Relacionado con la menstruación	Afecta a mujeres, influido por hormona sexuales (estrógenos/progesterona) (95).
Inflamatorios	Asma eosinofílica	Eosinofilia (>2-3% esputo), inicio tardío, grave, responde a anti-IL5 o anti-IL4Rα (95,102)
	Asma neutrofílica	Neutrofilia (>60-70% en esputo), respuesta Th17, asociado a tabaco/infecciones, tratamiento anti-TNF, anti-IL17, anti-TSP (103).
	Asma paucigranulocítica (PGA)	Baja presencia de neutrófilos y eosinófilos; resistente a corticoides (104).

FEV1= Volumen espiratorio forzado en el primer segundo; IL= Interleucina; Ig= Inmunoglobulina; Th= Linfocitos T Helper; TNF= Factor de necrosis tumoral; TSLP= Linfopoyetina estromal del timo.

Tabla 6: Clasificación de los endotipos de asma, adaptado de *Kuruvilla et al* y traducida al español(97).

Características	Endotipo T2 alto	Endotipo T2 bajo
Mecanismo inmunológico	Mediado por Th2 (hipersensibilidad tipo I)	Mediado por células Th1 y Th17
Citocinas implicadas	IL-4, IL-5, IL-13	IFN- γ (Th1), IL-17A, IL17F, IL-22 (Th17)
Tipo de inflamación	Eosinofílica	Neutrofílica o paucigranulocítica
Otras células involucradas	Mastocitos	NKT invariantes, células $T\gamma\delta$, células citotóxicas
Manifestaciones clínicas	Asma alérgica	Asma de inicio tardío relacionado con obesidad, tabaquismo, EPOC-asma.
Respuesta al tratamiento	Respuesta a terapias biológicas dirigidas (anti-IL-5, IL-4/IL-13, IgE)	Resistencia a corticoides
Referencias bibliográficas	(97,102,105–107)	(97,107–109)

IL= Interleucina; Th= Linfocito T Helper; IFN= Interferón; Ig= Inmunoglobulina

2.4.5 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

El diagnóstico de asma se fundamenta en la historia clínica y en la confirmación funcional de obstrucción bronquial reversible. Los síntomas típicos incluyen tos, disnea, sibilancias y opresión torácica, con predominio nocturno o matutino, y pueden desencadenarse por infecciones, ejercicio, alérgenos o irritantes. El examen físico puede revelar sibilancias, aunque su ausencia no excluye la enfermedad (89).

La espirometría es la prueba principal para evaluar la función pulmonar, determinando el grado de obstrucción y su reversibilidad. Los parámetros clave incluyen (89,110,111):

- FEV1: volumen espiratorio forzado en 1 segundo; <80% sugiere obstrucción.
- FVC: capacidad vital forzada.
- PEF: flujo espiratorio máximo; una variabilidad >20% sugiere asma.
- Relación FEV1/FVC <0,7 indica obstrucción.

La prueba broncodilatadora es positiva si FEV1 aumenta >12% y >200ml tras la administración de salbutamol (111).

Complementariamente, la medición de FeNO (fracción exhalada de óxido nítrico) (>40 ppb en adultos sin tratamiento esteroideo) puede indicar inflamación eosinofílica endotipo T2 (89).

Por último, la identificación de desencadenantes mediante pruebas alérgicas y el uso de cuestionarios estandarizados son útiles para personalizar el tratamiento y valorar el control y pronóstico de la enfermedad (89,111,112).

2.4.6 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO: BIOMARCADORES

El objetivo en la enfermedad asmática, en especial del asma grave, es la medición de la gravedad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. Los biomarcadores para la identificación de los distintos endotipos y fenotipos del asma son útiles para su manejo y tratamiento.

En la siguiente tabla, se muestran todos los biomarcadores disponibles en distintas muestras biológicas para el seguimiento y control del asma (**Tabla 7**).

Tabla 7: Biomarcadores en asma según el tipo de muestra biológica. Fuente: Elaboración propia.

Biomarcador	Muestra biológica	Utilidad clínica	Limitaciones	Referencias
Eosinófilos	Sangre	Marcador indirecto de inflamación eosinofílica; útil para predecir respuesta a terapias anti-IL5 y anti-IgE.	No refleja con precisión inflamación tisular; influido por corticoides, exposición a alérgeno y estrés.	(113–115)
Eosinófilos	Espujo	Gold estándar para inflamación T2; útil para guiar tratamiento, punto de corte >3%.	Técnica semiinvasiva, requiere procesamiento especializado.	(97,115)
Neutrófilos	Sangre/Espujo	Elevados en asma grave y en el endotipo Th17; asociación con inflamación neutrofílica	Menor respuesta a corticoides.	(115)
IgE en suero	Sangre	Evalúa atopia, predice respuesta a tratamiento anti-IgE (omalizumab).	Se correlaciona con gravedad y función pulmonar disminuida.	(97,114)
Periostina	Sangre	Indicador de inflamación persistente tipo T2; útil en terapias anti-IL13 y anti-IgE	En investigación	(97,115)
FeNO	Aire exhalado	Correlación con iNOS, inflamación T2, control de asma y respuesta al tratamiento.	Reducción tras tratamiento con corticoides, antagonistas de leucotrienos y omalizumab.	(97,115)
Bromotirosina	Orina	Asociación con activación eosinofílica pulmonar; correlación con gravedad y exacerbaciones.	En fase de validación	(116)
Prostaglandina D2/Leucotrieno E4	Orina	Indicadores de asma inducido por AINES.	En fase de validación	(116)

Th= Linfocito T helper; iNOS= óxido nítrico sintasa inducible; FeNO= fracción exhalada de óxido nítrico; IL= interleucina

2.5 TRATAMIENTO

Tanto la urticaria crónica como el asma son enfermedades inmunomediadas complejas y de difícil manejo. Para optimizar su tratamiento, las guías internacionales, como la de la **Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI)** y la **Iniciativa Global del Asma (GINA)**, proporcionan recomendaciones basadas en la evidencia para garantizar un abordaje terapéutico adecuado en los pacientes (98,117).

En el manejo de la UCE según la guía internacional de la EAACI, GA²LEN (Global Allergy and Asthma European Network, Red Europea de Alergia y Asma), EuroGuiDerm (European Guidelines for Dermatology, Guías Europeas de Dermatología) y APAACI (Asia Pacific Association of Allergy, Asthma and Clinical Immunology, Asociación Asia-Pacífico de Alergia, Asma e Inmunología Clínica), se recomienda tratar la enfermedad de la forma más eficaz y segura posible con el objetivo de alcanzar un UAS7=0, un control completo de la enfermedad y una normalización de la calidad de vida del paciente (14).

El tratamiento de la UCE se basa en tres pilares (14):

- **Evaluación:** diagnóstico clínico, factores desencadenantes, comorbilidades, severidad, las preferencias del paciente y los efectos adversos del medicamento escogido.
- **Actuación:** Modificar el tratamiento y tratar las comorbilidades, dar educación al paciente.
- **Ajuste terapéutico:** Escalado de dosis ante falta de control, cambio de fármaco por efectos adversos, o desescalado tras 3-6 meses sin síntomas.

El tratamiento se clasifica en terapias de primera línea y en terapias dirigidas, en función de la respuesta clínica y del perfil del paciente.

Terapias de primera línea

Antihistamínicos H1 de segunda generación

Los antihistamínicos H1 constituyen la primera línea de tratamiento con una eficacia estimada en el 45-60% de los pacientes (118). La respuesta al tratamiento depende del grado de ocupación de los receptores H1, ya que los fármacos actúan como agonistas inversos, estabilizando al receptor H1 en su conformación inactiva (118). En condiciones fisiológicas, la histamina desplaza el equilibrio del receptor hacia la conformación activa, lo que provoca vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular. Por ello, estos medicamentos compiten con la histamina por la unión al receptor.

Estudios en adultos mayores han demostrado que los antihistamínicos pueden revertir el perfil inmunológico tipo Th2, característicos de enfermedades alérgicas, promoviendo un tipo respuesta Th1 (119).

En la práctica clínica, se recomienda los antihistamínicos anti-H1 de segunda generación, ya que presentan menos efectos adversos (no son sedantes, menos sequedad bucal y no atraviesan la barrera hematoencefálica)(118,120). El tratamiento debe mantenerse durante un periodo de 2 a 4 semanas y si la urticaria no se controla, se recomienda incrementar la dosis 4 veces más que la dosis estándar (121).

Los antihistamínicos de segunda generación han demostrado presentar efectos inmunomoduladores en el contexto de la urticaria crónica espontánea. Estudios in vivo e in vitro han demostrado que algunos antihistamínicos como cetirizina, loratadina y desloratadina inhiben la expresión de células proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α), así como de quimiocinas y suprimen la activación de la vía de transcripción NF- κ B, clave en la cascada de inflamación alérgica (122,123). Asimismo, interfieren en la adhesión y migración de eosinófilos y neutrófilos, inhibiendo la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y P-Selectina, lo que contribuiría a una menor infiltración celular en el tejido diana (124).

Inmunosupresores

- **Ciclosporina:** Es un fármaco inmunomodulador que inhibe la producción de ciertas citoquinas involucradas en el desarrollo de los linfocitos T, en concreto de la IL-2, aunque se ha demostrado efecto también sobre las funciones de los linfocitos B (125). Un estudio de metaanálisis observó una mejoría en aquellos pacientes con UCE a nivel de calidad de vida y en la actividad de la enfermedad (126,127) Por otro lado, aquellos pacientes con UCE tipo IIb respondían mejor al tratamiento con ciclosporina (128).
- **Hidroxicloroquina:** Se trata de un antimalárico utilizado para el manejo de algunas enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Se ha comprobado la utilidad de la hidroxicloroquina como tratamiento alternativo al omalizumab, observándose una mejoría de la calidad de vida y la remisión de la enfermedad en un periodo de 12 meses (126).
- **Otros inmunosupresores:** Otras alternativas como azatioprina o micofenolato han demostrado la eficacia en pacientes con UCE refractaria (126,129,130).

En el caso del asma, el manejo adecuado tiene como principales objetivos el control eficaz de los síntomas, el mantenimiento de una actividad diaria normal y la minimización de riesgos, como exacerbaciones, la limitación del flujo aéreo o efectos secundarios (89).

El tratamiento farmacológico debe adaptarse de acuerdo con el nivel de control del paciente, teniendo en cuenta la efectividad terapéutica, la seguridad y el coste de las distintas alternativas (110).

Para garantizar un manejo óptimo, se sigue un enfoque escalonado, lo que implica ajustar el tratamiento de manera continua en función del control de la enfermedad.

Tratamiento de primera línea

Glucocorticoides

Los glucocorticoides son la primera línea de tratamiento en la enfermedad asmática, debido a su efecto antiinflamatorio e inmunomodulador (98). El tratamiento se inicia a dosis bajas y se ajusta progresivamente según gravedad y el nivel de control de la enfermedad (131). Diversos estudios han demostrado su eficacia en la mejoría de los síntomas y en la función pulmonar. *Chen et al* (132) observaron una mejoría de los síntomas en pacientes con asma severa en tratamiento con corticoesteroides combinados con agonistas β_2 de acción prolongada (LABA). Además, los glucocorticoides inhalados (GCI) han mostrado mejorar el FEV1 pre y postbroncodilatador, reduciendo también la hiperreactividad bronquial e inflamación epitelial (133,134).

Desde el punto de vista inmunológico, los corticoides inhiben la activación y migración de los linfocitos T, así como la maduración de las células dendríticas, reduciendo su capacidad de presentación antigénica y su presencia en la mucosa bronquial (135). En pacientes con asma aguda o persistente, los corticoesteroides reducen los niveles de IL-5, sCD25 y proteína catiónica eosinofílica, marcadores de la activación tipo Th2 (136). Asimismo, inducen la expansión de las células mediante la expresión de FOXP3 e IL-10 (137).

En pacientes con asma severa o resistente, se ha observado una alteración en la respuesta a corticoides, asociado a un desequilibrio en las poblaciones de células dendríticas mieloides y plasmacitoides (138), así como una regulación deficiente del receptor de glucocorticoides y de genes antiinflamatorios como MKP-1 en neutrófilos (139).

Antagonistas de leucotrienos

Los antagonistas de leucotrienos representan una alternativa eficaz en aquellos pacientes asmáticos que no toleran o rechazan el uso de corticoides (98).

Han demostrado mejorar la función pulmonar, con aumentos significativos de FEV1 y PEFR al mes de tratamiento además de reducir la presencia de eosinófilos activados y mastocitos en el tejido pulmonar (140,141).

Desde el punto de vista inmunológico, inhiben la activación de las células dendríticas, disminuyen la secreción de la quimiocina RANTES y limitan la proliferación de los linfocitos T (142). En modelos murinos, se observó una reducción de eosinófilos en el lavado broncoalveolar (BAL), junto con niveles disminuidos de IL-5 e IL-13, IgE y VCAM-1 (143). En pacientes pediátricos, se observaron mayores niveles de CD4⁺CD25⁺ Treg, IL-10 e IFN- γ y niveles reducidos de IL-4, IL-5 e IL-6, produciendo el desequilibrio Th2/Th1 (144).

LABA

Los agonistas β_2 de acción prolongada son broncodilatadores utilizados en el tratamiento de asma persistente, especialmente, en aquellos pacientes que no consiguen un control adecuado de los síntomas con los glucocorticoides (98). En el asma, el uso de LABA con corticoides ofrece un mejor control del asma, así como de la función pulmonar, síntomas y reducción de exacerbaciones (145). A nivel inmunológico, los LABA actúan como estabilizadores celulares, disminuyendo la liberación de histamina y leucotrienos por los mastocitos (146). Asimismo, un tratamiento con corticoides y LABA reduce la liberación de algunas citoquinas típicas de la cascada alérgica como IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, TNF- α y TSLP en vías aéreas, mejorando la hiperreactividad bronquial (147).

Terapias dirigidas

Omalizumab

El Omalizumab es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado tipo IgG1k dirigido contra la IgE aprobado en el 2003 para el tratamiento de asma alérgica moderada a severa y en 2014 para la urticaria crónica espontánea refractaria a antihistamínicos (21).

Su mecanismo de acción se basa en la unión a la región C ϵ 3 de la IgE libre con alta afinidad (148), inhibiendo su unión a los receptores de alta y baja afinidad (Fc ϵ RI y Fc ϵ RII) presentes en mastocitos y basófilos (21,126,149). Esta unión forma complejos Omalizumab-IgE (trímeros y hexámeros) (148) sin inducir el entrecruzamiento del receptor ni la desgranulación de la célula efectora (148) y reduciendo los niveles de IgE libre y la expresión de los receptores en las células efectoras (21). Además de estos efectos, el omalizumab disminuye la proporción de linfocitos B sin alterar otras subpoblaciones celulares (150) y reduce la producción de citoquinas proinflamatorias por linfocitos T como GM-CSF, IL-2 e IL-13 (151).

Su administración es por vía subcutánea con una biodisponibilidad del 62% alcanzando concentraciones plasmáticas máximas a los 7-8 días después de su administración, y una vida media aproximada de 26 días, superior a la de la IgE libre (2 a 3 días) (148).

Durante el tratamiento con omalizumab, disminuyen los niveles séricos de IgE libre en más de un 96%, aunque la IgE total aumenta tras su administración. Esto es debido a que los complejos omalizumab-IgE se eliminan más lentamente que la IgE libre, lo que da lugar a la presencia de ambos tipos de IgE en suero. Por lo tanto, los pacientes con UCE y asma tratados con omalizumab presentarán incremento aparente de la IgE, lo cual estará relacionado con la respuesta al tratamiento (148,152). Tras la suspensión del tratamiento, la IgE se incrementa gradualmente, pero sin alcanzar los niveles previos al tratamiento (148).

El omalizumab está aprobado para dosis de 150 y 300 mg cada 4 semanas recomendándose iniciar con 300 mg (21) por su mayor eficacia clínica y velocidad de respuesta (153).

En los pacientes con asma, el omalizumab ha demostrado una reducción en el número de exacerbaciones, mejoría en el control de la enfermedad, aumento de la calidad de vida, disminución de la toma de glucocorticoides inhalados y un aumento significativo en el FEV1 (154).

Otros anticuerpos monoclonales

Dupilumab: Es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor IL-4/IL-13R α inhibiendo la señalización de IL-4 e IL-13, citoquinas clave en la respuesta Th2. Su acción reduce los niveles séricos de IgE y limita la acción de mastocitos y basófilos (126). Está aprobado para la UCE refractaria a antihistamínicos y omalizumab, así como para asma grave, demostrando eficacia clínica en ambas enfermedades (155,156).

Terapias Anti-IL5 (Mepolizumab, Reslizumab, Benralizumab): La IL-5 participa en la activación y migración de eosinófilos, implicados en el proceso inflamatorio de la UCE y asma grave (73,126,156).

Los anticuerpos dirigidos contra la IL-5 (Mepolizumab y Reslizumab), o contra su receptor (Benralizumab), reducen la inflamación eosinofílica, lo que resulta beneficioso en pacientes con asma grave y algunos casos de UCE.

Rituximab: Es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano dirigido contra el CD20, lo que permite la depleción de los linfocitos B, incluidas las células B de memoria, productoras de autoanticuerpos (157). Se ha propuesto para la UCE refractaria por su capacidad de inhibir autoanticuerpos IgG contra los receptores Fc ϵ RI o IgE, a través de la eliminación de los linfocitos B de memoria (126,157,158).

Secukinumab: Anticuerpo monoclonal anti-IL17A, una citoquina involucrada en la patogénesis de la UCE. La IL-17 se ha relacionado con la actividad de la enfermedad y su bloqueo ha demostrado mejorar habones y prurito, sugiriendo un rol terapéutico potencial (126,159).

Inhibidores TNF α : El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) es una citoquina proinflamatoria que se encuentra elevada en pacientes con UCE (126). Los inhibidores de TNF- α han mostrado eficacia clínica, con remisión de respuesta y tiempos de respuesta promedio de 13 meses (160).

Inmunoglobulinas IV: Las inmunoglobulinas intravenosas inactivan células T autorreactivas, inhiben la producción de anticuerpos por los linfocitos B y bloquean la actividad mediada por el receptor Fc ϵ R (126). Estudios han demostrado su utilidad en UCE refractaria, con mejoría clínica sostenida hasta 12 meses (161,162).

Terapias en investigación

Anticuerpos monoclonales anti-IgE (Ligelizumab, UB211):

- Ligelizumab: Se une con mayor afinidad que el omalizumab a la IgE, reduciendo la IgE libre y la expresión de Fc ϵ RI en basófilos(126,163,164).
- UB221: Se une a IgE unida a CD23, inhibiendo su producción; presenta alta afinidad y produce una disminución rápida de la IgE sérica (165).

Inhibidores de la tirosin quinasa de Bruton (BTK): Inhiben la señalización de células B mediada por IgE(158)(166). Fármacos como Fenebrutinib, Remibrutinib y Rilzabrutinib han mostrado su eficacia en UCE refractaria (126).

3. HIPÓTESIS

El tratamiento con omalizumab, un fármaco biológico anti-IgE, induce cambios significativos en la regulación de la respuesta inmunitaria en enfermedades mediadas por IgE, como en Urticaria Crónica y Asma grave alérgica, afectando no solo la vida media de la IgE, sino también la respuesta inmune adaptativa. Esto se traduce en modificaciones en las subpoblaciones linfocitarias presentes en la sangre periférica.

El análisis de las subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo identifica potenciales biomarcadores en sangre periférica para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de enfermedades inmunomediadas por IgE, así como la respuesta al tratamiento con omalizumab.

4. OBJETIVOS

1. Utilizar la citometría de flujo para identificar cambios a nivel de subpoblaciones linfocitarias tipo T en sangre periférica en pacientes con enfermedades inmunomediadas por IgE (específicamente la Urticaria Crónica y Asma Grave alérgica), en comparación con un grupo de donantes sanos.
2. Definir biomarcadores en sangre periférica de respuesta terapéutica en pacientes con Urticaria Crónica y Asma Grave en tratamiento con omalizumab que permitan monitorizar la respuesta al tratamiento en estos pacientes.
3. Evaluar el impacto del tratamiento con anti-IgE (omalizumab) sobre la modulación de la respuesta inmunitaria adaptativa.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

COHORTE URTICARIA CRÓNICA

Estudio prospectivo en el que se incluyeron donantes sanos, pacientes con Urticaria Crónica Espontánea (UCE) en tratamiento con omalizumab y pacientes de urticaria crónica espontánea sin tratamiento con anti-IgE.

Donantes sanos

Como grupo control, se incluyó el grupo de 50 controles sanos (HD) utilizados en el proyecto ENTIRE HIP-C (167), siendo el sexo femenino el predominante (28 mujeres y 22 hombres) con una edad media de 38,8 años (Desviación estándar: 11,48).

Pacientes diagnosticados de Urticaria Crónica

Realizamos un estudio prospectivo de 71 pacientes con UCE, mayores de 18 años, reclutados entre 2014 y 2021 en los departamentos de Alergología y Dermatología del Hospital Germans Trias i Pujol, Barcelona. Dentro de este grupo, 33 pacientes estaban bajo tratamiento con omalizumab desde hace 6 meses (**UCE-OZB**) (8 hombres y 25 mujeres) y 38 (15 hombres y 23 mujeres) bajo tratamiento con antihistamínicos (**UCE-NID**).

Se incluyeron pacientes que iniciaron tratamiento con omalizumab después de una respuesta inadecuada a cuatro veces la dosis estándar de antihistamínico bajo supervisión médica, siguiendo las pautas europeas sobre urticaria crónica. La dosificación inicial y administración de omalizumab fueron de 300 mg cada cuatro semanas, y se monitorizó siguiendo el algoritmo establecido para el tratamiento de UCE con omalizumab por la “Xarxa d’Urticaria Catalana i Balear”(168).

Los pacientes menores de 18 años, con otra enfermedad alérgica, en tratamiento con algún otro fármaco biológico o en estado de inmunosupresión fueron excluidos del estudio.

La recopilación de datos se realizó de forma anónima y conforme a los códigos de investigación médica, tras la aprobación del Comité de Ética de nuestro hospital.

Se registró la historia clínica de los 33 pacientes en tratamiento con omalizumab, incluyendo antecedentes de otras enfermedades autoinmunes (presencia de anticuerpos), angioedema asociado (diagnóstico clínico), puntuación en la escala UAS 7 (evaluación de la gravedad de la

urticaria) y atopía asociada (prueba de punción cutánea o Prick Test). Se completaron los cuestionarios sobre el control de la UCE antes y seis meses después del tratamiento.

Dentro de la cohorte principal, se realizó un inmunofenotipado mediante citometría de flujo a 51 pacientes, de los cuales 24 pertenecían al grupo tratado con omalizumab y 27 al grupo tratado con antihistamínicos. Asimismo, se llevó a cabo el test de activación de basófilos (TAB) en 45 pacientes, incluyendo 22 tratados con omalizumab y 25 tratados con antihistamínicos.

De manera complementaria, se reclutó una segunda cohorte compuesta por 38 pacientes. En este grupo, 14 fueron evaluados antes de iniciar el tratamiento (T0) y 24 tras 6 meses en tratamiento con omalizumab (T6), aunque no todos los pacientes contaban con ambas mediciones.

Finalmente, para el análisis intraindividual, se seleccionó una subcohorte de 9 pacientes de este mismo grupo, en los cuales se obtuvieron muestras pareadas en T0 y T6.

El diagrama del estudio se muestra en la **Figura 7**

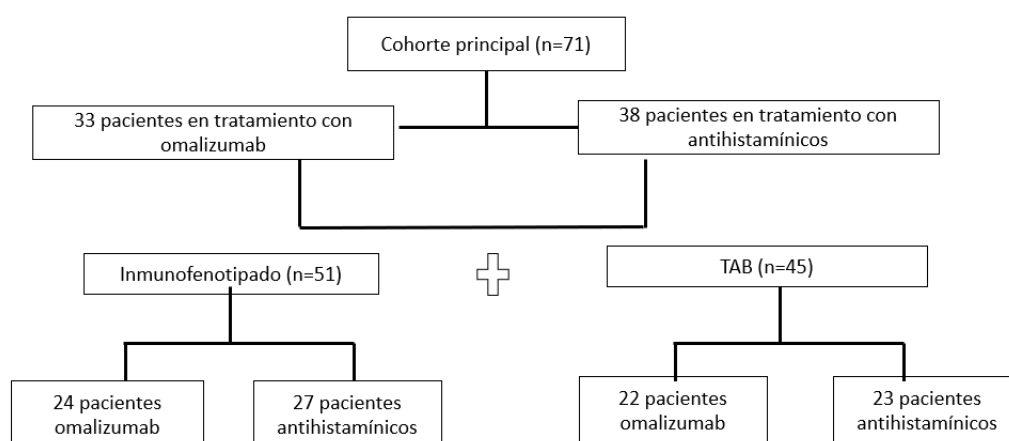


Figura 7A: Diseño del estudio de los pacientes incluidos en la cohorte de UCE. Se muestra la cohorte principal y su distribución entre los diferentes ensayos incluidos en el estudio. Cada rama representa uno de los ensayos y el número de participantes asignados a cada uno.

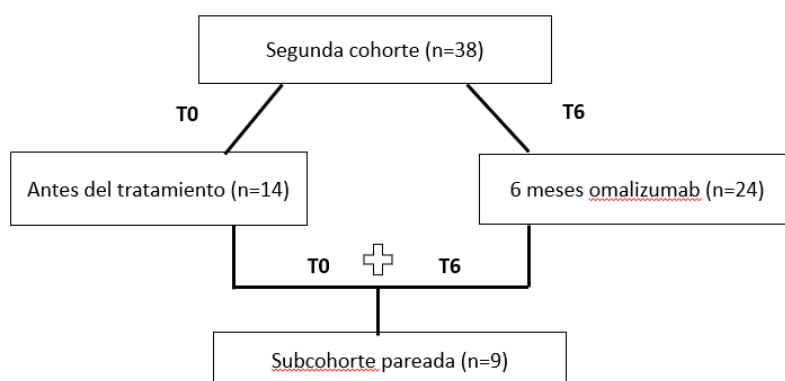


Figura 7B: Diseño del estudio complementario: estructura de las cohortes y puntos temporales de evaluación. T0: tiempo antes del tratamiento, T6: tiempo a los 6 meses de tratamiento de omalizumab.

COHORTE ASMA GRAVE

Estudio prospectivo en el que se incluyeron donantes sanos, pacientes diagnosticados de asma grave alérgica en tratamiento con omalizumab y pacientes diagnosticados de asma grave sin tratamiento con omalizumab en comparación con asma leve-moderado.

Donantes sanos

Como grupo control, se incluyó el grupo de 50 donantes sanos (HD) utilizados para la cohorte de urticaria crónica.

Pacientes diagnosticados de asma grave alérgica en tratamiento con anti-IgE

Se realizó un estudio prospectivo de 26 pacientes con asma grave (14 mujeres y 12 hombres) en tratamiento con omalizumab desde hace más de un año (**AG-OZB**), con edades comprendidas entre los 18-74 años, reclutados entre 2014 y 2022 en los departamentos de Alergología y Neumología del Hospital Germans Trias i Pujol, Barcelona.

Se incluyeron pacientes diagnosticados de asma grave que iniciaron tratamiento con omalizumab después de no conseguir un control adecuado de la enfermedad a pesar de recibir terapia en etapa 4 de GINA (89).

Los pacientes menores de 18 años, con otra enfermedad alérgica, en tratamiento con algún otro fármaco biológico o en estado de inmunosupresión fueron excluidos del estudio.

Se analizaron muestras de sangre periférica de pacientes en tratamiento con omalizumab y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes. La recopilación de datos se realizó de forma anónima y conforme a los códigos de investigación médica, tras la aprobación del Comité de Ética de nuestro hospital.

Se registró la historia clínica de los 26 pacientes en tratamiento con omalizumab, incluyendo antecedentes familiares, edad inicio de asma, niveles de IgE total, IgE específica a inhalantes, eosinófilos, basófilos, consumo de tabaco, parámetros de espirometría (CVF, FEV1, IT, FeNO, ACT, PBD) y número de exacerbaciones/año.

Pacientes diagnosticados de asma grave sin tratamiento con omalizumab

Se llevó a cabo un estudio prospectivo que incluyó 40 pacientes con asma grave (**AG-SA**), de los cuales 24 eran mujeres y 16 hombres, con edades comprendidas entre los 18 y 74 años. Estos pacientes fueron reclutados entre los años 2014 y 2022 en los departamentos de Alergología y Neumología del Hospital Germans Trias i Pujol, Barcelona.

Para la inclusión en el estudio, se consideraron pacientes diagnosticados con asma grave según las recomendaciones de la GINA (98), sin necesidad de tratamiento con agentes biológicos, pero sí con inmunosupresores como corticoides. Se recopilaron datos sobre antecedentes familiares relevantes, edad de inicio del asma, número de exacerbaciones por año, pauta de tratamiento de corticoides, hábito de tabaquismo y parámetros de espirometría, incluyendo la capacidad vital forzada (FVC), el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1), la relación FEV1/CVF, el óxido nítrico exhalado (FeNO) y la respuesta broncodilatadora postbronquial (PBD).

Pacientes diagnosticados de asma leve-moderado

Se realizó un estudio prospectivo en el que se incluyeron 18 pacientes diagnosticados de asma leve/moderado (**AG-MA**), de los cuales 11 eran mujeres y 7 hombres, con edades comprendidas entre los 18 y 62 años. Estos pacientes fueron reclutados en el año 2023-2024 en el departamento de Alergología del hospital Germans Trias i Pujol.

Para la inclusión en el estudio, se consideraron pacientes diagnosticados con asma leve/moderado, según las recomendaciones de la GINA (98), sin necesidad de tratamiento con agentes biológicos. Se recopiló todo el historial clínico de los pacientes y se realizaron las pruebas requeridas para el control del asma.

5.1.1 JUSTIFICACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL

El objetivo principal del estudio fue caracterizar y comparar subpoblaciones linfocitarias y biomarcadores inflamatorios entre distintos fenotipos clínicos y grupos terapéuticos. El tamaño muestral estuvo condicionado por la limitada disponibilidad de datos previos que permitieran estimar el tamaño del efecto esperado en las subpoblaciones linfocitarias de interés. Por este motivo, no se realizó un cálculo formal previo de tamaño muestral; en su lugar, se aplicó un muestreo consecutivo, incluyendo a todos los pacientes que cumplían criterios de inclusión durante el periodo de reclutamiento.

Este tamaño muestral permite detectar diferencias de magnitud moderada en biomarcadores inflamatorios y, especialmente, en las subpoblaciones linfocitarias, que constituyen el objetivo principal del estudio.

5.2 PRUEBAS ALÉRGICAS

En los pacientes diagnosticados de urticaria crónica, se realizó la prueba del prick test teniendo en cuenta los siguientes alérgenos (Leti Laboratories SA): ácaros del polvo (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*), fungi (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus spp*, *Penicillium spp.*), epitelios (gato y perro), polenes de árbol (*Cupressus sempervivens*, *Platanus acerifolia*, *Pinus radiata*, *Quercus ilex*, *Olea europea*), malezas (*Parietaria judaica*, *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium album*, mezcla de polenes de malezas) y gramíneas (*Cynodon dactylis* and *Lolium perennial*). Cuando la prueba de mezcla de polen de maleza resultó positiva, se realizó un análisis más detallado utilizando *Plantago ovata*, *Salsola Kali* y *Mercurialis annua*.

En los pacientes asmáticos, se realizaron pruebas cutáneas a una batería estándar de neuroalérgenos y alimentos formada por: ácaros del polvo (*Dermatophagoides pteronyssinus*; *Dermatophagoides farinae*; *Acarus siro*; *Lepidoglyphus destructor*), fungi (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus spp*, *Penicillium spp*), epitelios (gato y perro), latex, árboles (*Cupressus sempervivens*, *Platanus acerifolia*, *Pinus radiata*, *Quercus ilex*, *Olea europea*, *parietaria*, *altimira*, *chenopodium*), hierbas, (*Cynodon*, *lolium*). Para todos ellos se utilizó un control negativo (suero fisiológico) y un control positivo (histamina).

La lectura de los resultados se realizó a los 15 minutos después de la aplicación del alérgeno. La prueba se considera positiva si el diámetro del habón medio es $\geq 3\text{mm}$. Se excluyeron los resultados si el habón del control negativo era $\geq 3\text{mm}$ y si el del control positivo $< 3\text{mm}$. Debido a que algunos medicamentos pueden enmascarar los resultados de las pruebas cutáneas, se tuvieron en cuenta los periodos de lavado necesarios antes de la realización de las pruebas.

Además, se analizaron los siguientes parámetros séricos: IgE total, IgE específica contra alérgenos como Anisakis, Tri a 19, Pru p3 y aeroalérgenos como D.Farinae, D. Pteronyssinus, epitelios, malezas, hongos, entre otros mediante inmunocap (Phadia®, Thermo Fisher Scientific Massachussets, EEUU).

5.3 MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las muestras de sangre fueron obtenidas mediante venopunción. La sangre coagulada fue centrifugada para obtener el suero, el cual fue almacenado a -20°C. Para el análisis de las subpoblaciones linfocitarias, las muestras fueron recolectadas en tubos de EDTA y almacenadas a temperatura ambiente, siendo analizadas dentro de las 4 horas posteriores a la extracción.

La velocidad de sedimentación globular (VSG) y el dímero-D (DD) fueron analizados en plasma utilizando el analizador inmunológico DxH 900 (Beckman Coulter, Indianápolis, EEUU), mientras que la proteína C reactiva (PCR) fue analizada en muestras de suero utilizando el equipo AU-5800 (Beckman Coulter).

5.4 ESPIROMETRÍA

Los pacientes realizaron una espirometría para obtener la capacidad vital forzada (FVC), volumen espirado forzado en 1 segundo (FEV1), el óxido nítrico exhalado (FeNO) y la respuesta broncodilatadora postbronquial (PBD). Para ello, se tendrán en cuenta los valores de normalidad de cada una de las determinaciones.

5.5 INMUNOFENOTIPADO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Mediante citometría de flujo con dos citómetros de 3 láseres y 10 colores (FACSLytic™) y otro con 4 láseres y 14 colores (LSRFortessa II), se realizó el análisis fenotípico de las subpoblaciones linfocitarias de interés en sangre periférica.

Tabla 8: Panel de anticuerpos utilizados con el marcaje correspondiente y la cantidad a utilizar para la determinación de las subpoblaciones de linfocitos T.

PANEL 1

Anticuerpo	Fluorocromo	Clona	Casa Comercial	Cantidad (μl)
CD45	AF700	HI30	BioLegend	0,5
CD3	V450	UCHT1	BD Biosciencias	2,5
CD8	APCH7	SK1	BD Biosciencias	2,5
CD4	PerCpy5	SK3	BD Biosciencias	1,25
CD38	APC	HB7	BD Biosciencias	10
HLA-DR	V500	G46-6	BD Biosciencias	2,5
CD45RA	PEcy7	HI 100	BD Biosciencias	2,5
CCR7	PE	150503	BD Biosciencias	10
CCR6	BV605	29-2L17	BioLegend	1,25
CXCR3	AF800	S18001A	Biolegend	1,25

PANEL 2

Anticuerpo	Fluorocromo	Clona	Casa comercial	Cantidad (μl)
CD4/CD8	FITC	SK3/SK1	BD Biosciencias	6
CD3	PerCP	SK7	BD Biosciencias	8
CD45	APC	2D1	BD Biosciencias	1
CD16⁺CD56⁺	V450	B159	BD Biosciencias	5+1
CD19	V500	H1B19	BD Biosciencias	1

Se analizaron las diferentes subpoblaciones linfocitarias descritas en la **tabla 9**. Adicionalmente, para todas las muestras se realizó un conteo con Perfect Count Beads (Cytognos) con tal de obtener el número absoluto de linfocitos y poder cuantificar cada una de las subpoblaciones linfocitarias estudiadas.

5.5.1 PROCEDIMIENTO DE LA TINCIÓN DE SUPERFICIE DE LAS MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Para llevar a cabo la tinción de superficie de las muestras, se incubaron 100µL de sangre total junto con la mezcla de anticuerpos detallados en la **tabla 8**, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 2ml de solución de lisis (BD FACS Lysing Solution) y se incubó durante 7 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz.

Seguidamente, se centrifugó a 1200rpm durante 5 minutos y se decantaron las muestras. Se realizó un lavado con 3 ml de tampón de lavado y se centrifugó nuevamente a 1200 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 200 µL de tampón de lavado para la adquisición por el citómetro.

Los anticuerpos utilizados forman parte de un panel previamente validado para su uso en la práctica clínica rutinaria del laboratorio. Este panel se emplea de forma estandarizada en los procedimientos diagnósticos habituales y cumple los criterios de validación establecidos por el centro y corresponde al panel descrito y consensuado por el HIP-C (167).

5.5.2 PROCEDIMIENTO DE CONTAJE CON PERFECTCOUNT

Para todas las muestras, se realizó un marcaje de 25 µL de sangre total con el anticuerpo monoclonal CD45PerCP (BD Bioscience), el cual se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz.

Posteriormente, para lisar la muestra, se añadieron 450µL de solución de lisis (BD FACS Lysing Solution) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz, Finalmente, se añadieron mediante pipeteo reverso, 25 µL de Perfect Count beads (Cytognos).

Tabla 9: Caracterización fenotípica de las subpoblaciones de linfocitos T

Subpoblaciones Linfocitarias	Fenotipo	Panel de anticuerpos
Linfocitos T	CD3 ⁺ CD45 ⁺	Panel 1
CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	
CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	
DN	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	
DP	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	
Linfocitos B	CD45 ⁺ CD19 ⁺	
NK	CD45 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁻ CD45 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	
NKT	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	

Subpoblaciones linfocitarias	Fenotipo	Panel de anticuerpos
Linfocitos T CD8 ⁺		Panel 2
LT CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	
LT CD8 ⁺ naïve	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁺	
LT CD8 ⁺ memoria central (CM)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁻	
LT CD8 ⁺ memoria efectora (EM)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CCR7 ⁻ CD45RA ⁻	
LT CD8 ⁺ células efectoras terminales (TEMRA)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CCR7 ⁻ CD45RA ⁺	
LT CD8 ⁺ activados	CD3 ⁺ CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ CD38 ⁺ / CD3 ⁺ CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	
Linfocitos TCD4 ⁺		
LT CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	
LT CD4 ⁺ naïve	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁺	
LT CD4 ⁺ memoria efectora (EM)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁻ CD45RA ⁻	Panel 2
Th1 memoria efectora	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁻ CD45RA ⁻ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻	
Th2 memoria efectora	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁻ CD45RA ⁻ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁻	
Th17 memoria efectora	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁻ CD45RA ⁻ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺	
LT CD4 ⁺ memoria central (CM)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁻	
Th1 memoria central	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁻ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻	
Th2 memoria central	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁻ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁻	
Th17 memoria central	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁻ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺	
LT CD4 ⁺ células efectoras terminales (TEMRA)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁻ CD45RA ⁺	
LT CD4 ⁺ activadas	CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ CD38 ⁺ / CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	

5.5.3 ADQUISICIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La adquisición por citometría de flujo se realizó mediante dos citómetros FACSLytic™ y LSRFortessa II, utilizando el software FACSDiva (BD Bioscience) para su análisis. Se adquirieron 100,000 linfocitos por cada tubo de caracterización fenotípica. Para los tubos de conteo, se adquirieron 5000 beads.

5.5.4 ANÁLISIS CITOMÉTRICO

El análisis de las subpoblaciones linfocitarias se realizó utilizando el software FACSDiva (BD Bioscience) (**Figura 8**).

El esquema seguido para hacer el análisis se realizó después de eliminar impurezas y restos celulares (dobletes) a partir de los singletes. Se seleccionaron los linfocitos mediante el marcador CD45⁺ y de estos, los que eran CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ y los linfocitos dobles positivos (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺). Por otro lado, desde los linfocitos, mediante los marcadores CD16⁺CD56⁺ se seleccionaron las células NKT (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), las células NK (CD16⁺CD56⁺) y linfocitos B mediante el marcador CD19⁺.

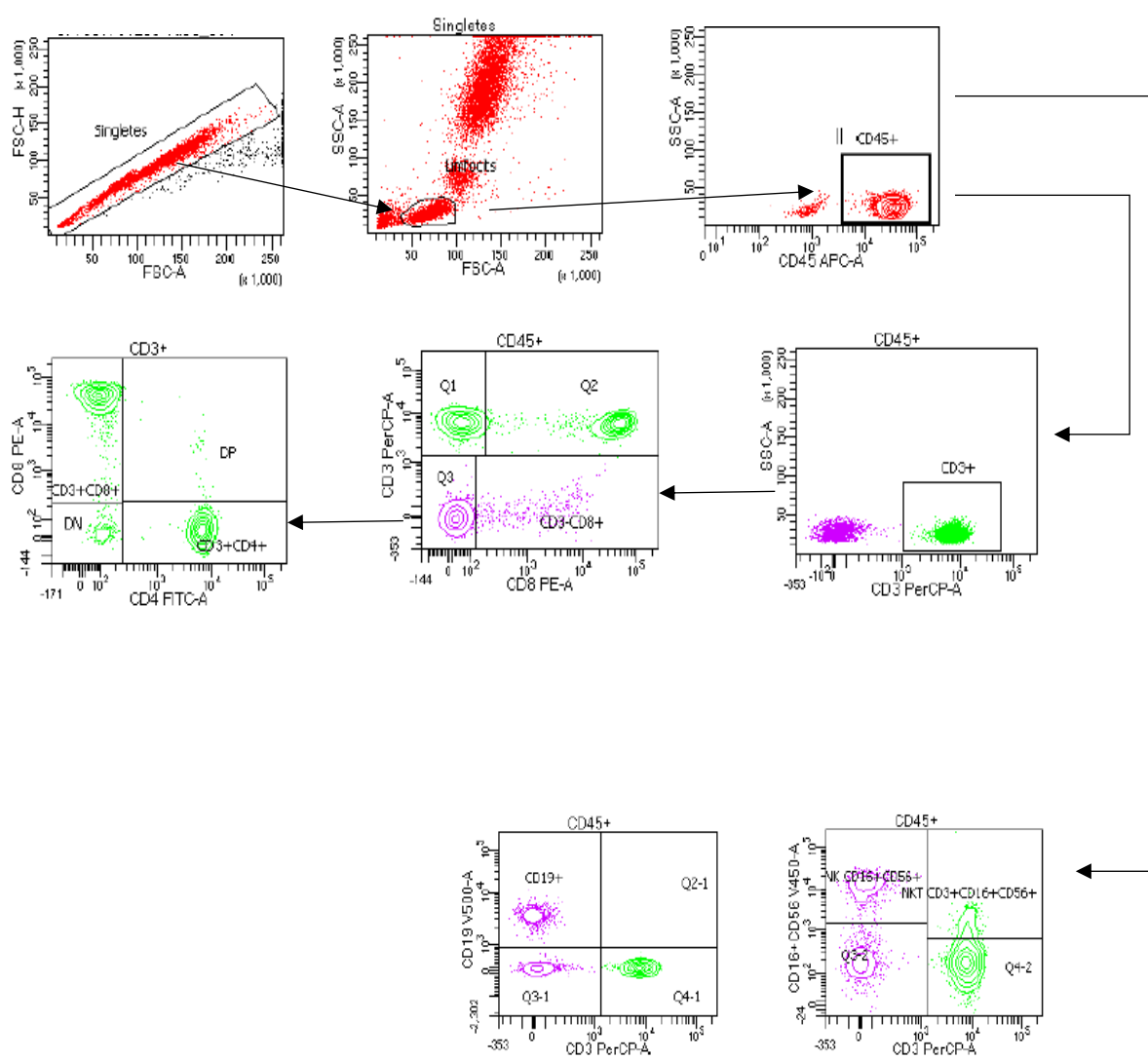


Figura 8: Estrategia de análisis de subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, dobles positivas (CD4⁺CD8⁺), dobles negativas (DN), NK (CD16⁺CD56⁺), NKT (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) y linfocitos B (CD45⁺CD19⁺).

5.5.5 ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES TIPO T

La estrategia utilizada para analizar las subpoblaciones T ($CD4^+$, $CD8^+$) fue diferente según el grado de maduración y activación, utilizando marcadores como CCR7, CD45RA, HLADR y CD38.

El procedimiento consistía en eliminar las impurezas y restos celulares (dobletes) a partir de los singletes, seguido por la selección de los linfocitos y la identificación de los $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$. En ambos tipos de linfocitos ($CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$), se analizaba la expresión de CD45RA, CCR7 y HLADR. Mediante el análisis de los marcadores CD38 y HLADR, distinguiremos entre células activadas y no activadas.

Además, el marcador CCR7 nos permitió diferenciar los diferentes estadios de maduración de los linfocitos T (Naïve, memoria central, memoria efectora, EMRA) (Figura 9).

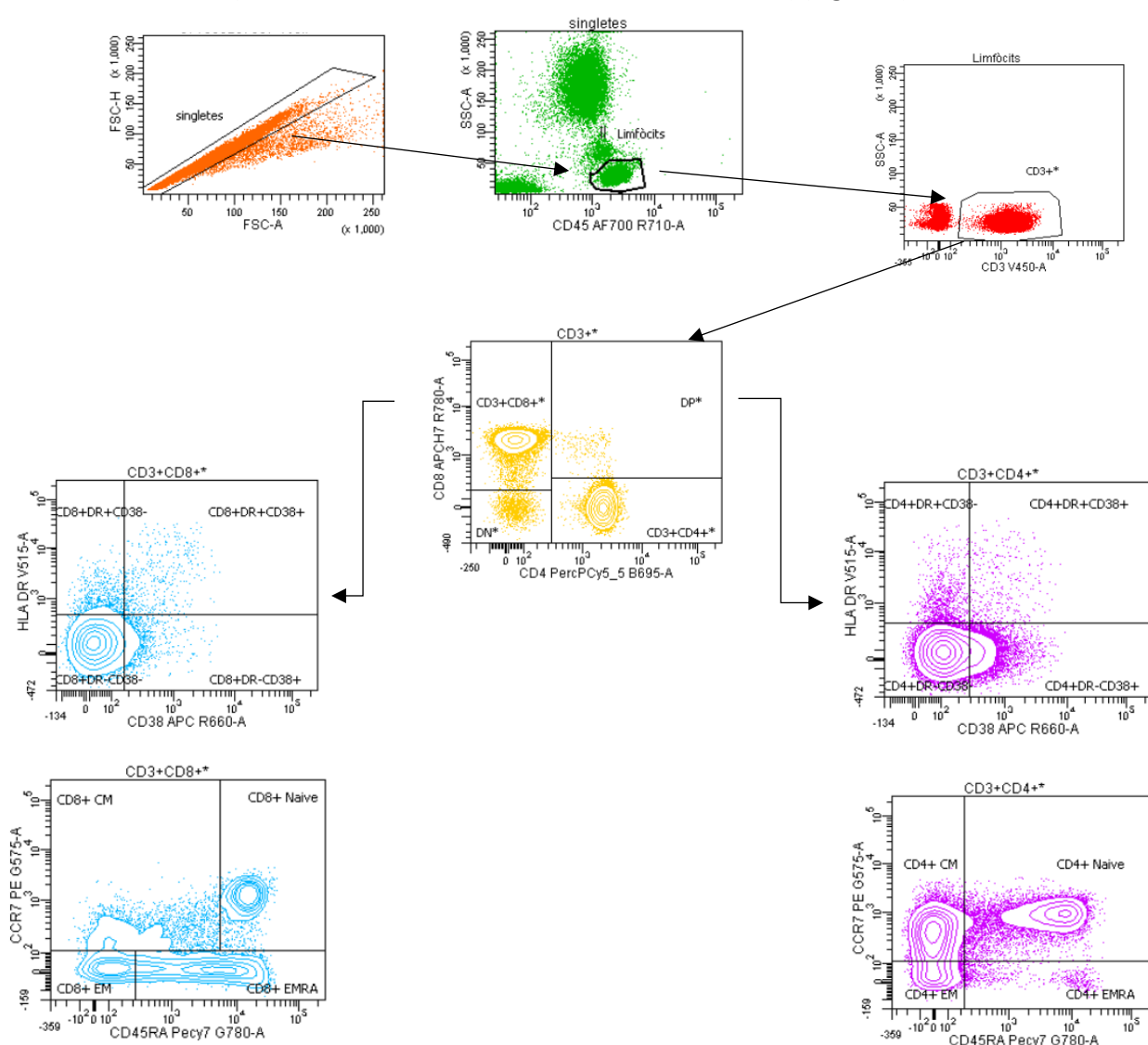


Figura 9: Estrategia de análisis de los estadios de maduración y activación de los linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ en función de la expresión de los marcadores de maduración CD45RA, CCR7 y marcadores de activación HLA-DR y CD38. CM= memoria central; EM= memoria efectora; EMRA= subpoblación efectora.

5.5.6 ANÁLISIS DE LAS SUBPOBLACIONES T CD4

A partir de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺, se seleccionaron mediante el marcador CCR7 y CD45RA, los distintos estadios de maduración de los linfocitos T CD4⁺: Naïve (CD45RA⁺ CCR7⁺), Memoria Central (CD45RA⁻CCR7⁺), Memoria Efectora (CD45RA⁻CCR7⁻) y EMRA (CD45RA⁺CCR7⁻). A partir de cada subpoblación de memoria, se seleccionaron las distintas subpoblaciones T helper gracias al marcador CXCR3 y CCR6: Th1 memoria central (CD45RA⁻CCR7⁺CXCR3⁺CCR6⁻), Th1 Memoria efectora (CD45RA⁻CCR7⁻CXCR3⁺CCR6⁻), Th2 memoria central (CD45RA⁻CCR7⁺CXCR3⁻CCR6⁻), Th2 memoria efectora (CD45RA⁻CCR7⁻CXCR3⁻CCR6⁻), Th17 memoria central (CD45RA⁻CCR7⁺CXCR3⁻CCR6⁺) y Th17 memoria efectora (CD45RA⁻CCR7⁻CXCR3⁻CCR6⁺) (**Figura 10**).

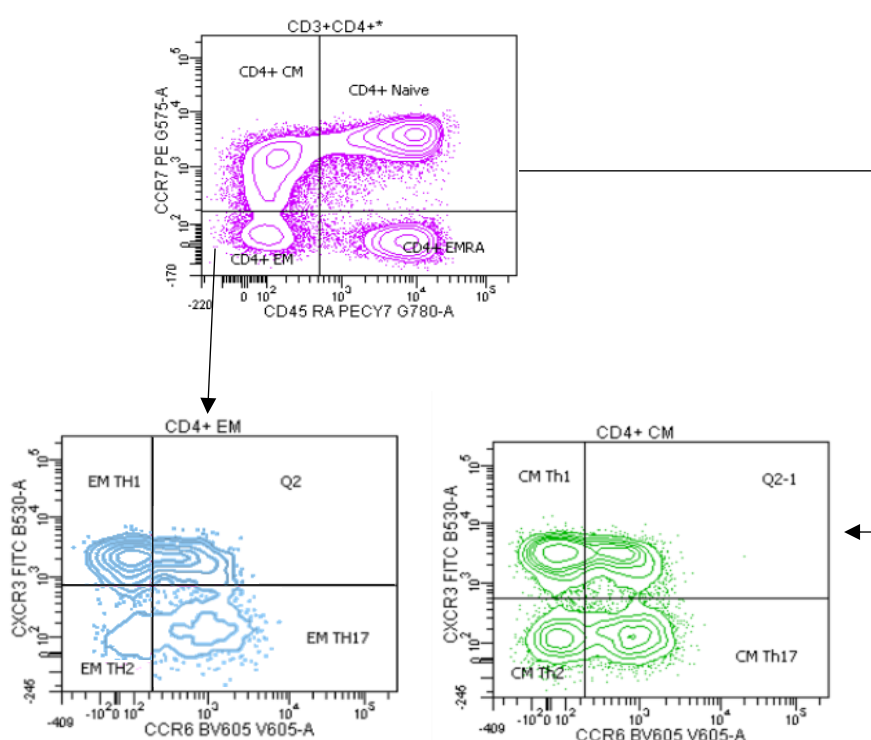


Figura 10: Estrategia de análisis para las subpoblaciones linfocitarias T helper y de memoria en base a la expresión de marcadores de maduración CD45RA, CCR7, así como marcadores de memoria CXCR3 y CCR6, respectivamente. EM= memoria efectora, CM= memoria central, EMRA= subpoblación efectora.

5.5.7 ANÁLISIS FUNCIONAL: TEST DE ACTIVACIÓN DE BASÓFILOS

El test de activación de basófilos indirecto (TAB indirecto) se considera una técnica útil para el diagnóstico de urticaria crónica autoinmune. El ensayo consiste en incubar el suero del paciente con basófilos del donante evaluando los marcadores de activación en la superficie de los basófilos. El TAB indirecto se ha validado como una técnica in vitro sensible y específica para identificar autoanticuerpos (IgG unidos a IgE o a su receptor de alta afinidad) en pacientes diagnosticados de urticaria crónica espontánea.

La desgranulación de los basófilos se evaluó por citometría de flujo, utilizando la expresión de CCR3 y CD63 en la superficie celular (Flow Cast®; Bühlmann, Suiza).

Para el TAB indirecto se seleccionaron siete donantes sanos con edades entre 21 y 38 años, todos con un grupo sanguíneo O+ para evitar reacciones inespecíficas con anticuerpos ABO presentes en el suero del paciente. Estos donantes se designaron como donantes de basófilos a lo largo de todo el estudio.

La reactividad de las células del donante se testó mediante la incubación de dos controles positivos (anti-FcεRI y fMPL), los cuales pueden estimular a los basófilos a través de diferentes vías de señalización (**Figura 11**).

El protocolo utilizado se basa en varios estudios realizados en pacientes diagnosticados de UCE (169–171). Se incubaron 50 µl del suero del paciente con 50 µl de sangre del donante de basófilos. Tras una incubación de 15 minutos a 37 °C, las muestras se lisaron y lavaron con los reactivos proporcionados por el kit. Los basófilos se identificaron mediante la expresión de CCR3 en el canal de dispersión lateral (SSC) y los basófilos activados según la expresión de CD63. Las células se adquirieron y analizaron utilizando la expresión de CCR3, adquiriendo un mínimo de 500 basófilos totales en un citómetro FACSLyrics (BD Biosciences).

El TAB se consideró positivo si se cumplía alguno de los siguientes criterios:

1. El porcentaje de basófilos CD63⁺ mayor al 5%
2. Índice de estimulación (SI) igual o superior a 2, calculado como el porcentaje de células CD63⁺ inducidas por el suero del paciente dividido entre las células CD63⁺ inducidas por el control negativo.

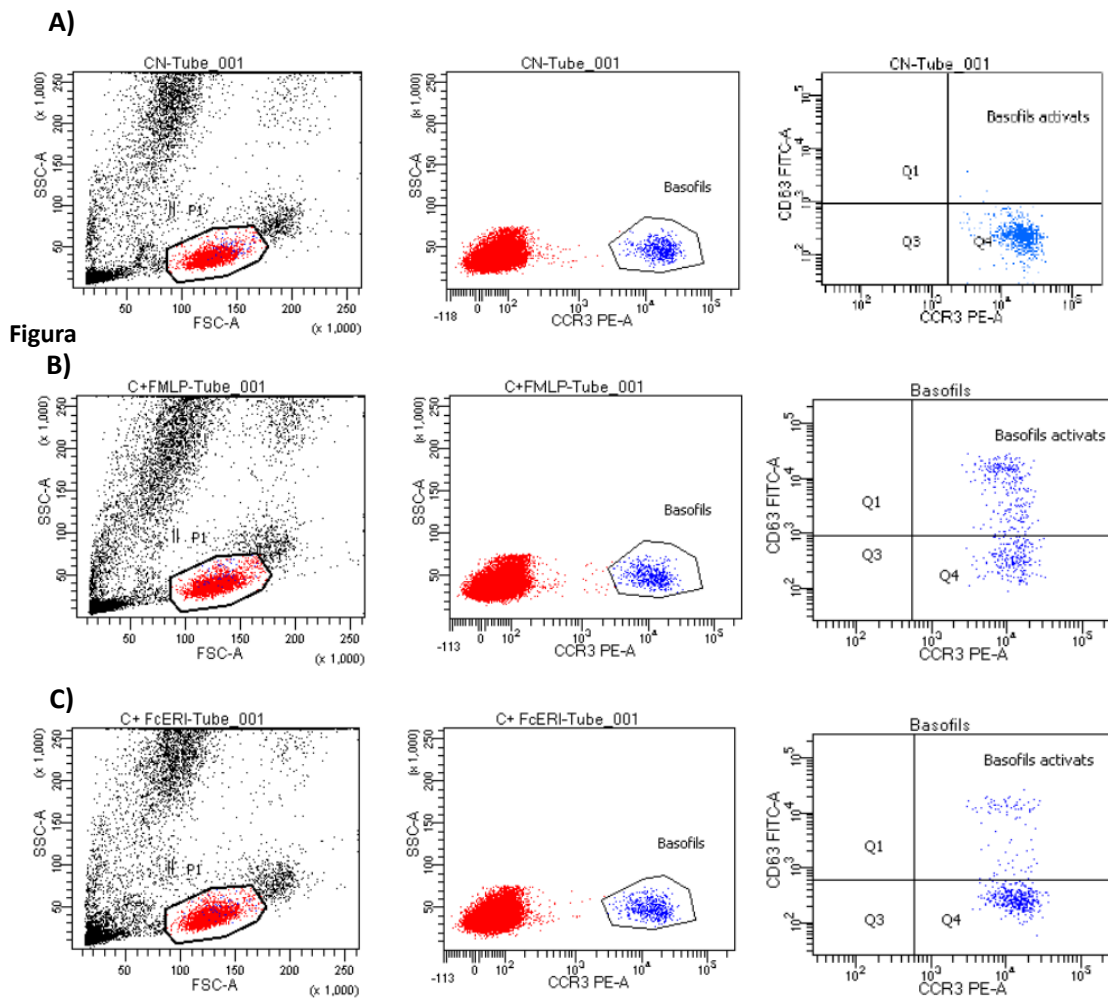


Figura 11: Estrategia de análisis para el test de activación de basófilos: Los basófilos se identifican dentro de la región correspondiente a linfocitos/monocitos. Se caracteriza por una baja dispersión lateral (SS-A low) y el fenotipo CCR3⁺. Los basófilos activados se identifican por la expresión CCR3⁺CD63⁺. La región de CD63 se establece utilizando el control negativo **(A)** y la activación de basófilos se evalúa como el aumento de la señal por encima de esa región en las distintas condiciones de estimulación, ya sea con muestras o con controles positivos **FMLP** (N-formyl-Met-Leu-Phe) **(B)** y/o FcεRI (receptor de alta afinidad de la IgE) **(C)**.

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El estudio estadístico se llevó a cabo utilizando técnicas descriptivas e inferenciales, seleccionadas en función de la naturaleza de las variables y del diseño del estudio, que incluyó comparaciones transversales entre grupos, análisis longitudinales intraindividuales y contraste frente a controles sanos.

Las variables cuantitativas se expresaron como mediana y rango intercuartílico, según la distribución evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Las variables cualitativas se describieron como frecuencias absolutas y porcentajes. Para la comparación de biomarcadores séricos e inmunofenotipos linfocitarios entre grupos independientes (UCE-OZB, UCE-NID, AG-OZB, AG-SA, AG-MA y controles sanos) se emplearon pruebas paramétricas (T de Student o ANOVA) o no paramétricas (Mann-Whitney U o Kruskal-Wallis), según correspondiera. En los casos de ANOVA o Kruskal-Wallis, se realizaron comparaciones post hoc con corrección por comparaciones múltiples (Bonferroni o Dunn). Los datos se representaron mediante diagrama de cajas, mostrando la mediana, los cuartiles, los valores mínimos y máximo.

Para los análisis longitudinales en pacientes con UCE, se utilizaron pruebas para datos pareados (T pareada o Wilcoxon) comparando los valores pre y postratamiento.

Las asociaciones entre biomarcadores y subpoblaciones linfocitarias, se estudiaron mediante coeficientes de correlación de Pearson o Spearman, según la distribución de los datos. Se consideró estadísticamente significativa una $p < 0.05$.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GNU PSPP y GraphPad Prism (versión 10).

6. RESULTADOS

6.1 COHORTE URTICARIA CRÓNICA

6.1.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE URTICARIA CRÓNICA

La **Tabla 10** muestra las características clínicas de los pacientes con diagnóstico de urticaria crónica en tratamiento con antihistamínicos en comparación con los pacientes en tratamiento con omalizumab.

En cuanto a la cohorte de **urticaria crónica en tratamiento con antihistamínicos (UCE-NID)**, se reclutó un total de 38 pacientes, con un predominio del sexo femenino (n=23; 60,1%), con edades entre 18 y 83 años. La mayoría de los pacientes (n=23; 85%) fueron derivados al servicio de Dermatología.

En cuanto a los marcadores inflamatorios, el 30% de los pacientes presentaron elevaciones en los parámetros de VSG, DD y PCR. Asimismo, se detectó positividad para anticuerpos anti-TPO y anti-Tg en el 26% de los casos (n=7).

Respecto a la sensibilización alérgica, el 54% de los pacientes presentó IgE específica elevada frente a Anisakis, mientras que el 50% mostró niveles elevados de IgE total.

Dentro de la cohorte de **urticaria crónica en tratamiento con omalizumab (UCE-OMA)**, se observó también un predominio del sexo femenino (n=26; 77%), con edades comprendidas entre 19 y 75 años. El diagnóstico de urticaria se estableció entre los años 1996 y 2016. El 57% de los casos (n=18) fueron evaluados en el departamento de Alergología, mientras que el 43% restante (n=14) fue atendido por el servicio de Dermatología.

Los marcadores inflamatorios se vieron elevados en el 20% de los pacientes (n=6), y 5 presentaron positividad frente a anticuerpos anti-TPO y anti-Tg (16%). Asimismo, se registró la presencia de enfermedad autoinmune concomitante en 9 casos, siendo 7 mujeres. Entre las enfermedades asociadas, se encontraron diabetes mellitus tipo 1, colitis ulcerosa, psoriasis, hipotiroidismo o vitíligo. Respecto a las pruebas diagnósticas, el prick test fue positivo en el 52,6% de los pacientes, y se detectó IgE específica frente a Anisakis en el 18,2% de ellos con una IgE total elevada en el 62% de los casos.

6.1.2 RESPUESTA A OMALIZUMAB Y UAS 7 SCORE

Todos los pacientes incluidos en el estudio iniciaron tratamiento con omalizumab a una dosis de 300 mg mensuales, siguiendo el algoritmo establecido para el tratamiento de UCE con omalizumab por la “Xarxa d’Urticaria Catalana i Balear” (166). En caso de mejoría tras seguimiento y evaluación clínica a los 3 meses mediante las escalas de UAS 7 y UCT, se procedía a reducir la dosis a 150 mg mensuales, pudiendo extender el intervalo de tratamiento a 6 y 8 meses y considerar la suspensión de la terapia. Del total de pacientes que iniciaron el

tratamiento con omalizumab, el 79% (n=26) completó el esquema terapéutico, mientras que el 21% (n=7) interrumpió de forma anticipada debido a la ausencia de respuesta clínica satisfactoria.

La puntuación promedio en la escala UAS 7 previo al inicio del tratamiento fue de $30,11 \pm 9,7$ correspondiente a una actividad severa de la enfermedad (rango: 28-42).

Tras 6 meses de tratamiento con omalizumab en los pacientes que completaron el esquema terapéutico, se observó una disminución significativa en el valor medio del UAS 7, descendiendo hasta 5 puntos ($5 \pm 9,7$).

Esta reducción fue estadísticamente significativa ($p < 0,0001$), lo que indica una mejoría clínica relevante en la sintomatología de los pacientes.

Adicionalmente, se analizó la evolución del UAS 7 en función de la respuesta al tratamiento, diferenciando entre los pacientes que suspendieron el tratamiento por falta de eficacia y aquellos que lo completaron en su totalidad. En ambos grupos se observó una reducción en los valores de UAS 7, siendo esta más marcada en los pacientes que finalizaron el tratamiento ($6,54 \pm 10,84$ vs $27,8 \pm 6,9$).

A pesar de la diferencia, la disminución global en la puntuación de UAS 7 fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$), lo que respalda la eficacia del omalizumab en el manejo de la urticaria crónica.

6.1.3 MARCADORES SÉRICOS

A pesar del tratamiento con omalizumab, los pacientes con UCE mantuvieron niveles elevados de IgE sérica, sin observarse la disminución esperada asociada a la neutralización de IgE libre.

La mediana de IgE total en este grupo fue de 402 [9,6-1922] kU/L, en comparación con 111 [29,1-1411] kU/L ($p = 0,024$) en los pacientes en tratamiento con antihistamínicos, ambos por encima del valor de referencia (≥ 100 kU/L).

En cuanto al resto de marcadores séricos analizados, no se observaron diferencias significativas entre los grupos, con excepción de la proteína C reactiva (PCR), cuyos niveles fueron más elevados en los pacientes tratados con omalizumab [$25,50(0,3-21)$] vs $1,6(0,3-35,1)$; $p = 0,0001$).

Tabla 10: Características clínicas de la cohorte de urticaria crónica

Variable	UCE-NID (n=38)	UCE-OZB (n=33)	P Antihistamínicos vs omalizumab
Edad, media $\pm$ SD, años	41,8 $\pm$ 20,7	48,19[18-83]	ns
Sexo, N (%)	Femenino: 19(70,3)	Femenino: 26 (77)	ns
Departamento médico, N (%)	Alergología: (15%) Dermatología: 23 (85%)	Alergología: 18 (57) Dermatología: 14(43)	ns
Anticuerpos antitiroideos i,N (%positividad)	8 (30)	5 (16)	ns
Presencia de enfermedad autoinmunitaria	-	7 (21)	
Positividad para Prick test a inhalantes, N (%)	-	17(52,63)	
Positividad para IgE específica anisakis, N (%), mediana, IQ	7(26) 0,03 [0-66,6]	6(18,2) 0.02 [0-18,9]	ns
Elevación de IgE total, N (%) kU/L. Mediana, IQ	13 (50) 111 [29,1-1411]	20 (62) 402[9,6-1922]	0,024
D-Dímero, N (%) μ g/mL. Mediana,IQ	8(30) 310[63-1326]	6(18) 107[2,02-477]	0,023
VSG, N (%) ml/h, Mediana,IQ	5(19) 8,5[2-36]	8(24) 16,5[0,3-35,1]	0,058
PCR, N(%), mg/L Mediana,IQ	4(15) 1,6 [0,3-35,1]	9(27) 25,50[0,3-21]	0,0001

UCE-NID: tratamiento con antihistamínicos; UCE-OZB: tratamiento con omalizumab

6.1.4 EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTI-IGÉ EN EL SISTEMA INMUNOLÓGICO

6.1.4.1 TAB indirecto

Se analizaron los sueros de 45 pacientes (22 bajo tratamiento con omalizumab durante 6 meses y 23 en tratamiento con antihistamínicos) de los cuales el 17% (n=8) presentaron resultados positivos en el TAB. De estos pacientes positivos, sólo 3 pacientes (38%) estaban bajo tratamiento con omalizumab. Los resultados de los TABs se encuentran en las tablas **11 y 12**.

Tabla 11: Resultados de TAB positivo en pacientes con UCE según el número de basófilos adquiridos, porcentaje de activación de basófilos, índice de estimulación y tratamiento con omalizumab o antihistamínicos.

Nº paciente	Basófilos adquiridos	% Activación de basófilos	Índice de estimulación	Tratamiento
Control negativo	678	1,1	-	-
Paciente 1	538	7,2	6,5	omalizumab
Paciente 2	539	7,8	7,1	omalizumab
Paciente 3	657	19,0	17	omalizumab
Paciente 4	682	5,6	5,09	antihistamínico
Paciente 5	614	34,4	31	antihistamínico
Paciente 6	599	28,2	25	antihistamínico
Paciente 7	636	14,9	13,5	antihistamínico
Paciente 8	911	6,1	5,5	antihistamínico

UCE: urticaria crónica espontánea

Tabla 12: Resultados de TAB negativo en pacientes con UCE según el número de basófilos adquiridos, porcentaje de activación de basófilos, índice de estimulación y tratamiento con omalizumab o antihistamínicos.

Nº paciente	Nº basófilos adquiridos	% Activación de basófilos	Índice de estimulación	Tratamiento
C. Negativo	821	1,6	-	-
Paciente 9	768	3,6	2,25	omalizumab
Paciente 10	653	3,8	2,38	antihistamínico
Paciente 11	684	2,6	1,62	antihistamínico
Paciente 12	682	2,4	1,5	omalizumab
Paciente 13	685	3,6	2,25	omalizumab
Paciente 14	759	0,8	0,5	omalizumab
Paciente 15	628	1,3	0,81	antihistamínico
Paciente 16	636	1,1	0,68	antihistamínico
Paciente 17	671	1,8	1,13	antihistamínico
Paciente 18	630	1,7	1,06	antihistamínico
Paciente 19	750	1,1	0,69	omalizumab
Paciente 20	701	1,1	0,69	omalizumab
Paciente 21	781	1,0	0,63	omalizumab
Paciente 22	671	4,5	2,81	omalizumab
Paciente 23	556	4,5	2,81	omalizumab
Paciente 24	551	3,5	2,18	omalizumab
Paciente 25	552	3,6	2,25	Omalizumab
Paciente 26	894	3,4	2,13	antihistamínico

UCE: urticaria crónica espontánea

Nº paciente	Nº basófilos adquiridos	% Activación de basófilos	Índice de estimulación	Tratamiento
C. Negativo	821	1,6	-	-
Paciente 27	784	0,9	0,56	omalizumab
Paciente 28	939	0,5	0,31	antihistamínico
Paciente 29	917	0,1	0,06	antihistamínico
Paciente 30	848	0,7	0,43	antihistamínico
Paciente 31	873	0,5	0,31	antihistamínico
Paciente 32	944	0,7	0,43	antihistamínico
Paciente 33	879	0,9	0,56	antihistamínico
Paciente 34	846	1,5	0,94	omalizumab
Paciente 35	685	0,6	0,38	omalizumab
Paciente 36	636	0,9	0,56	omalizumab
Paciente 37	669	1,3	0,82	omalizumab
Paciente 38	534	1,3	0,82	antihistamínico
Paciente 39	614	0,3	0,19	antihistamínico
Paciente 40	632	1,6	1	antihistamínico
Paciente 41	574	1,0	0,63	omalizumab
Paciente 42	608	1,2	0,75	antihistamínico
Paciente 43	608	1,5	0,94	omalizumab
Paciente 44	649	1,4	0,88	antihistamínico
Paciente 45	867	0,1	0,063	antihistamínico

6.1.4.2 Caracterización fenotípica de las subpoblaciones tipo T

En el análisis de las subpoblaciones de linfocitos T y la caracterización del fenotipo de estos pacientes, se analizaron 24 pacientes, que estaban en tratamiento con omalizumab durante 6 meses, y 27 pacientes bajo tratamiento con antihistamínicos. Ambos grupos fueron comparados con un grupo control de 50 individuos sanos. Todos los datos completos de los cambios tanto en porcentajes como en recuentos absolutos de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T se presentan en las **tablas 13 y 14**.

Linfocitos T CD4⁺

Los pacientes con UCE tratados antihistamínicos presentaron porcentajes más altos de células naïve y porcentajes más bajos de subpoblaciones de memoria central en comparación con los individuos sanos (naïve CD4⁺: 58,90[23,6-74,9] vs 42 [15,7-74,9]%, $p=0,0001$; memoria central CD4⁺: 29,10 [13,4-61,5] vs 39,95 [2,1-58,3]%, $p=0,0001$; **Figura 12**).

En contraste, en los pacientes tratados con omalizumab, se observaron porcentajes disminuidos de células naïve e incrementados de células de memoria central en comparación con los tratados con antihistamínicos, restaurando valores similares a los observados en los individuos sanos (naïve CD4⁺: 43,40[22,1-62] vs 58,90 [23,6-71,9]%, $p=0,0025$; memoria central CD4⁺: 36,35 [19,5-62,9] vs 29,10 [13,4-61,5]%, $p= 0,0020$; **Figura 12**).

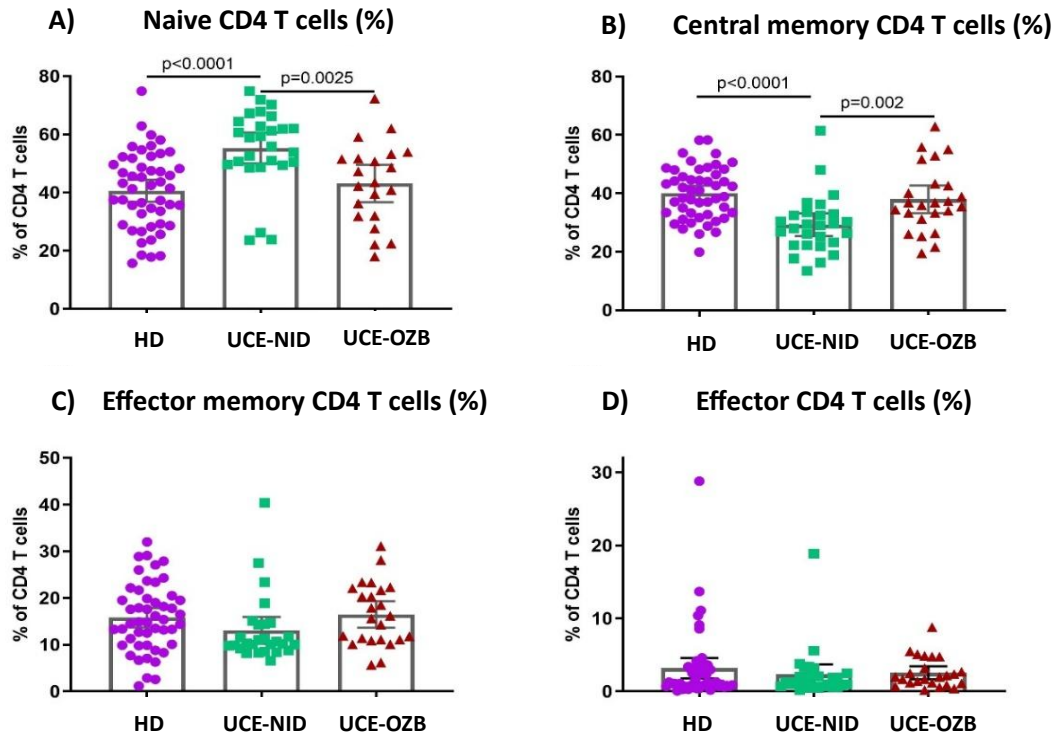


Figura 12: Adaptada de C. López *et al* (172). Diferencias en los porcentajes de las subpoblaciones CD4⁺ en pacientes con UCE en tratamiento con omalizumab a los 6 meses en comparación con aquellos tratados con antihistamínicos o el grupo de controles sanos. Porcentajes de (A) naïve, (B) memoria central, (C) memoria efectora y (D) CD4⁺ efectoras en sangre periférica en HD, UCE-NID y UCE-OZB. UCE, urticaria crónica espontánea; HD controles sanos (n=50); UCE-NID tratamiento con antihistaminicos (n=27); UCE-OZB, tratamiento con omalizumab (n =24). Se consideró significativa una p<0,05.

Tabla 13: Cambios en los porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias T en sangre periférica de controles sanos vs pacientes con omalizumab vs pacientes en tratamiento con antihistamínicos.

Subpoblaciones	Parent	HD		UCE- NID		UCE- OZB		HD VS UCE-NID (p)	HD Vs UCE-OZB (p)	UCE-NID VS UCE-OZB (p)
Linfocitos TCD4⁺	T cells	62,28	[44,4-83,9]	42,7	[25,1-69,9]	47,9	[32,9-63]	<0,0001	<0,001	0,38
Linfocitos T CD4 naïve	T CD4	42	[15,7-74,9]	58,90	[23,6-74,9]	43,40	[18,0-72,3]	<0,0001	0,628	0,0025
CD4 memoria central	T CD4	39,95	[19,9-58,3]	29,10	[13,4-61,5]	36,35	[19,5-62,9]	<0,0001	0,362	0,0020
CD4 memoria efectora	T CD4	14,85	[1,2-32]	10,30	[6,6-40,4]	15,90	[5,7-28,1]	0,0457	0,65	0,012
CD4 T EMRA	T CD4	1,46	[0,1-28,8]	1,3	[0,5-18,9]	2,0	[0,2-8,8]	0,356	0,644	0,186
CD4 T HLA-DR+CD38+	T CD4	1,23	[0,65-4,71]	0,80	[0,2-2,2]	1,05	[0,3-1,8]	<0,001	0,058	0,053
CD4 T HLA-DR+CD38-	T CD4	3,07	[0,96-12,1]	1,1	[0,6-4,8]	1,7	[0,5-16,2]	0,0001	<0,0001	0,073
CD4 T HLA-DR-CD38+	T CD4	37,7	[18,4-58,6]	53	[21,7-71,4]	41,60	[15,6-66,6]	<0,0001	0,41	0,0013
Th1 memoria central	T CD4 CM	8,6	[5,03-14,30]	6,4	[3,1-12,9]	8,2	[3,7-14,9]	0,0026	0,695	0,017
Th1 memoria efectora	T CD4 EM	5,25	[0,15-17,9]	4,2	[2,5-19,8]	6,4	[2,5-16,4]	0,485	0,084	0,004
Th2 memoria central	T CD4 CM	6,55	[0,22-13,8]	6,4	[3,1-15,0]	8,2	[3,7-14,9]	0,57	0,022	0,0168
Th2 memoria efectora	T CD4 EM	1,125	[0,13-10,8]	1,50	[0,5-20,5]	2,10	[0,6-7,4]	0,034	0,0025	0,224
Th17 memoria central	T CD4 CM	10,28	[0,46-19,5]	7,0	[0,3-19,9]	7,90	[0,0-20,6]	<0,0001	0,0033	0,115
Th17 memoria efectora	T CD4 EM	2,3	[0,18-20,12]	1,7	[0,4-3,1]	1,5	[0,0-5,1]	0,036	0,0135	0,671
Linfocitos T CD8⁺	T cells	31,3	[12,7-48,5]	23,5	[13,2-35,4]	23,6	[16,4-40,4]	<0,0001	0,0005	0,09
Linfocitos T CD8 naïve	T CD8	38,75	[10,5-70,7]	32,8	[5,9-78,1]	13,4	[6,5-48,2]	0,519	0,0002	0,057
CD8 memoria central	T CD8	10,85	[0,1-33,8]	10,1	[1,4-29,1]	15,20	[5,6-42,2]	0,81	0,059	0,090
CD8 memoria efectora	T CD8	17,75	[0,1-54]	14,80	[0,6-49,2]	13,20	[7-26,9]	0,412	0,073	0,56
CD8 T EMRA	T CD8	29,7	[3,5-66,7]	36,6	[8,5-77,6]	45,6	[14,6-73,1]	0,33	0,0007	0,042
CD8 T HLA-DR+CD38+	T CD8	2,00	[0,48-6,52]	2,7	[0,1-9,5]	2,4	[0,3-6,7]	0,37	0,077	0,862
CD8 T HLA-DR+CD38-	T CD8	4,57	[0,76-11,2]	4,7	[0,5-24,2]	5,05	[0,3-38,9]	0,97	0,486	0,719
CD8 T HLA-DR-CD38+	T CD8	7,87	[1,52-14,6]	19,10	[3-70,2]	16,45	[3-38,6]	<0,0001	0,0004	0,782

Los valores se expresan como porcentajes (%), mediana, rango intercuartílico (IQ). HD: controles sanos; UCE-NID: pacientes en tratamiento con antihistamínicos; UCE-OZB: pacientes en tratamiento con omalizumab; P <0,05 indica diferencia estadísticamente significativa entre grupos.

Tabla 14: Cambios en recuentos absolutos de subpoblaciones linfocitarias T en sangre periférica de controles sanos vs pacientes con omalizumab vs pacientes en tratamiento con antihistamínicos.

Subpoblaciones	Parent	HD	UCE-NID	UCE-OZB	HD VS UCE-NID (p)	HD Vs UCE-OZB (p)	UCE-NID VS UCE-OZB (p)			
Linfocitos T CD4 ⁺	T cells	807,5	[323-1520]	1022	[549-2167]	964	[526-2079]	0,0097	0,085	0,386
Linfocitos T CD4 naïve	T CD4	307,5	[92-682]	572	[137-1623]	401,5	[167-727]	0,0004	0,254	0,028
CD4 memoria central	T CD4	293,5	[13-813]	278	[130-459]	315,5	[179-840]	0,179	0,57	0,113
CD4 memoria efectora	T CD4	130	[7-336]	109,5	[57-406]	143	[59-300]	0,617	0,1545	0,102
CD4 EMRA	T CD4	12	[1-170]	13	[1-128]	18,50	[1-63]	0,83	0,704	0,583
CD4 HLA-DR+CD38+	T CD4	12,5	[4-32]	6,5	[2-28]	7,5	[2-27]	0,0002	0,004	0,294
CD4 HLA-DR+CD38-	T CD4	26	[7-155]	11	[4-48]	17	[3-206]	<0,0001	0,0101	0,161
CD4 HLA-DR-CD38+	T CD4	279,5	[120-776]	497,5	[204-1149]	370	[114-869]	0,0007	0,199	0,036
Th1 memoria central	T CD4 CM	67	[5-198]	84	[31-328]	121	[46-302]	0,221	0,022	0,134
Th1 memoria efectora	T CD4 EM	47	[1-176]	42	[15-201]	55	[27-221]	0,899	0,091	0,076
Th2 memoria central	T CD4 CM	50	[1-148]	49	[28-179]	72	[40-227]	0,592	0,0548	0,124
Th2 memoria efectora	T CD4 EM	10	[1-66]	13	[3-115]	21	[4-94]	0,037	0,0019	0,374
Th17 memoria central	T CD4 CM	83	[3-219]	56,5	[4-197]	70	[20-150]	0,0044	0,1912	0,296
Th17 memoria efectora	T CD4 EM	17,5	[2-168]	16	[3-42]	13,50	[4-60]	0,251	0,28	0,972
Linfocitos T CD8 ⁺	T cells	351,5	[134-1011]	502	[236-1218]	471	[238-646]	0,0045	0,314	0,095
Linfocitos T CD8 naïve	T CD8	135,5	[31-543]	145,5	[28-503]	68,50	[27-311]	0,915	0,008	0,084
CD8 memoria central	T CD8	43	[1-143]	57,5	[10-119]	64	[13-259]	0,121	0,040	0,378
CD8 memoria efectora	T CD8	71,5	[1-229]	77	[4-248]	63,5	[21-140]	0,59	0,41	0,31
CD8 EMRA	T CD8	133	[11-427]	181,5	[40-446]	179,5	[43-339]	0,090	0,040	0,835
CD8 HLA-DR+CD38+	T CD8	10,5	[1-489]	14,5	[3-63]	11	[1-27]	0,75	0,590	0,374
CD8 HLA-DR+CD38-	T CD8	17	[1-86]	28	[1-121]	17,5	[1-182]	0,30	0,5	0,617
CD8 HLA-DR-CD38+	T CD8	24,5	[5-119]	87	[11-350]	54,5	[22-158]	0,0001	0,0038	0,177

Los valores se expresan como recuentos (cél/μl), mediana y rango intercuartílico. HD: controles sanos; UCE-NID: pacientes en tratamiento con antihistamínicos; UCE-OZB: pacientes en tratamiento con omalizumab; P <0,05 indica diferencia estadísticamente significativa entre grupos.

Subpoblaciones de linfocitos T CD4 colaboradores:

En pacientes con UCE, se observó una disminución en el porcentaje de las células Th1 en comparación con individuos sanos, restaurándose los valores tras el tratamiento con omalizumab. Por otro lado, no se encontraron diferencias entre los pacientes tratados con antihistamínicos y los individuos sanos respecto a las células Th2, pero sus porcentajes se vieron incrementados en los pacientes tratados con omalizumab. En contraste, los porcentajes de células Th17 se encontraron disminuidos en los pacientes con UCE tratados con antihistamínicos y en aquellos en tratamiento con omalizumab, sugiriendo que el fármaco no tiene efecto sobre esta subpoblación celular (**Figura 13**).

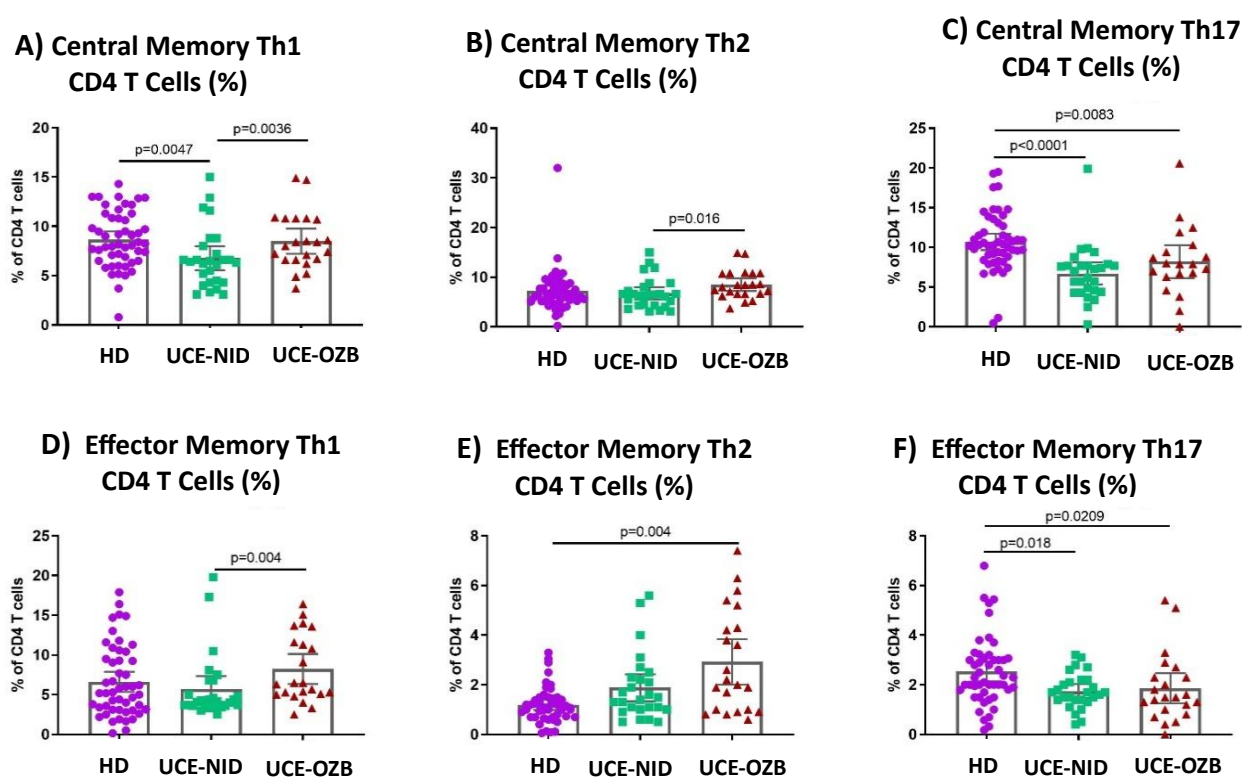


Figura 13: Adaptada de *C.López et al* (172). Diferencias en las subpoblaciones Th1, Th2, y Th17 observadas en pacientes con UCE en tratamiento con omalizumab a los 6 meses en comparación con aquellos tratados con antihistamínicos o el grupo de controles sanos. Porcentajes de (A) Th1 memoria central (B) Th2 memoria central (C) Th17 memoria central (D) Th1 memoria efectora (E) Th2 memoria efectora, (F) Th17 memoria efectora en sangre periférica en pacientes HD, UCE-NID y UCE-OZB. UCE, urticaria crónica espontánea; HD controles sanos (n=50); UCE-NID, tratamiento con antihistaminicos (n=27); UCE-OZB, tratamiento con omalizumab (n =24). Se consideró significativa una p<0,05.

Linfocitos T CD8⁺:

Los pacientes tratados con omalizumab presentaron porcentajes más bajos de células naïve y porcentajes más altos de las subpoblaciones efectoras en comparación con los pacientes tratados con antihistamínicos y los individuos sanos (naïve CD8⁺: 13,40 [6,5-48,2] vs 38,75 [10,5-70,7]%, $p=0,0002$; efector CD8⁺: 45,60 [6,6-73,1] vs 29,70 [3,5-66,7]%, $p=0,0007$); (**Figura 14**).

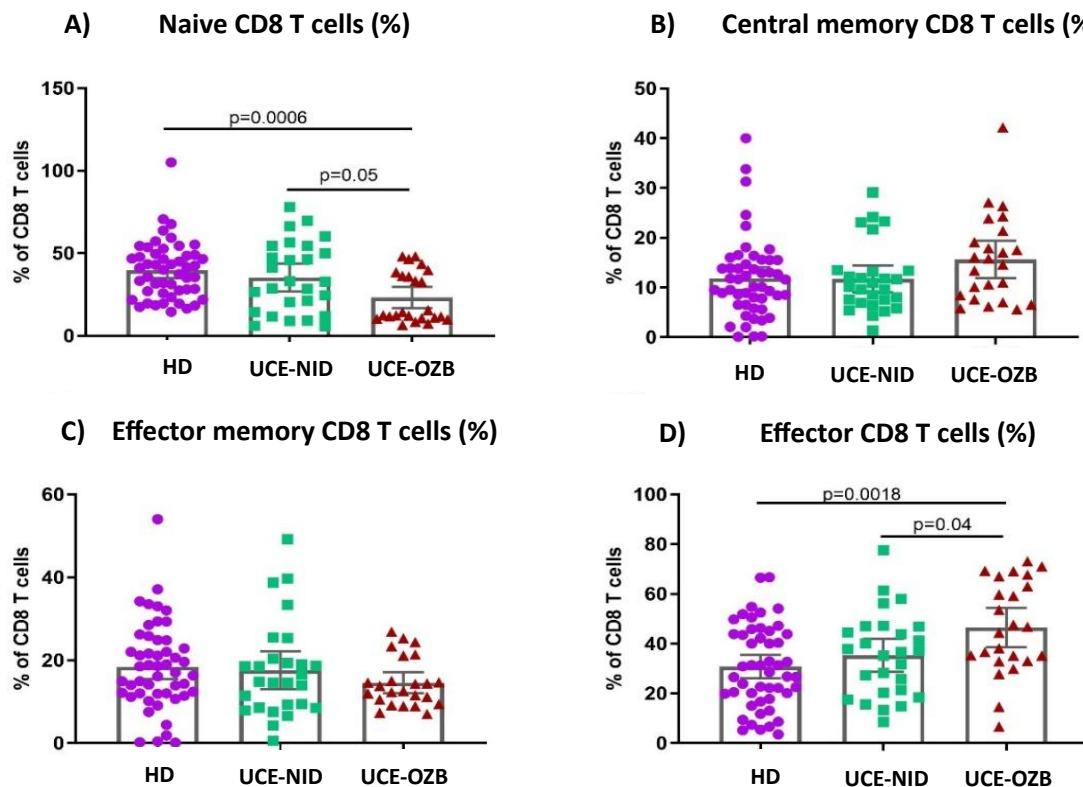


Figura 14: Adaptada de *C.López et al* (172). Diferencias en los porcentajes de las subpoblaciones CD8⁺ en pacientes con UCE en tratamiento con omalizumab a los 6 meses en comparación con aquellos tratados con antihistamínicos o el grupo de controles sanos. Porcentajes de (A) naïve, (B) memoria central, (C) memoria efectora y (D) CD8⁺ efectoras en sangre periférica en HD, UCE-NID y UCE-OZB. UCE, urticaria crónica espontánea; HD controles sanos (n=50); UCE-NID, tratamiento con antihistaminicos (n=27); UCE-OZB, tratamiento con omalizumab (n =24). Se consideró significativa una $p<0,05$.

Marcadores de activación de células T

En el análisis de los marcadores de activación HLA-DR y CD38, los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ que expresaban CD38, pero no HLA-DR estaban incrementados en los pacientes con UCE tratados con antihistamínicos, sin afectarse en aquellos pacientes tratados con omalizumab. Además, los linfocitos CD4⁺ que expresaban HLA-DR se encontraban disminuidos en aquellos pacientes con UCE (**Figura 15**).

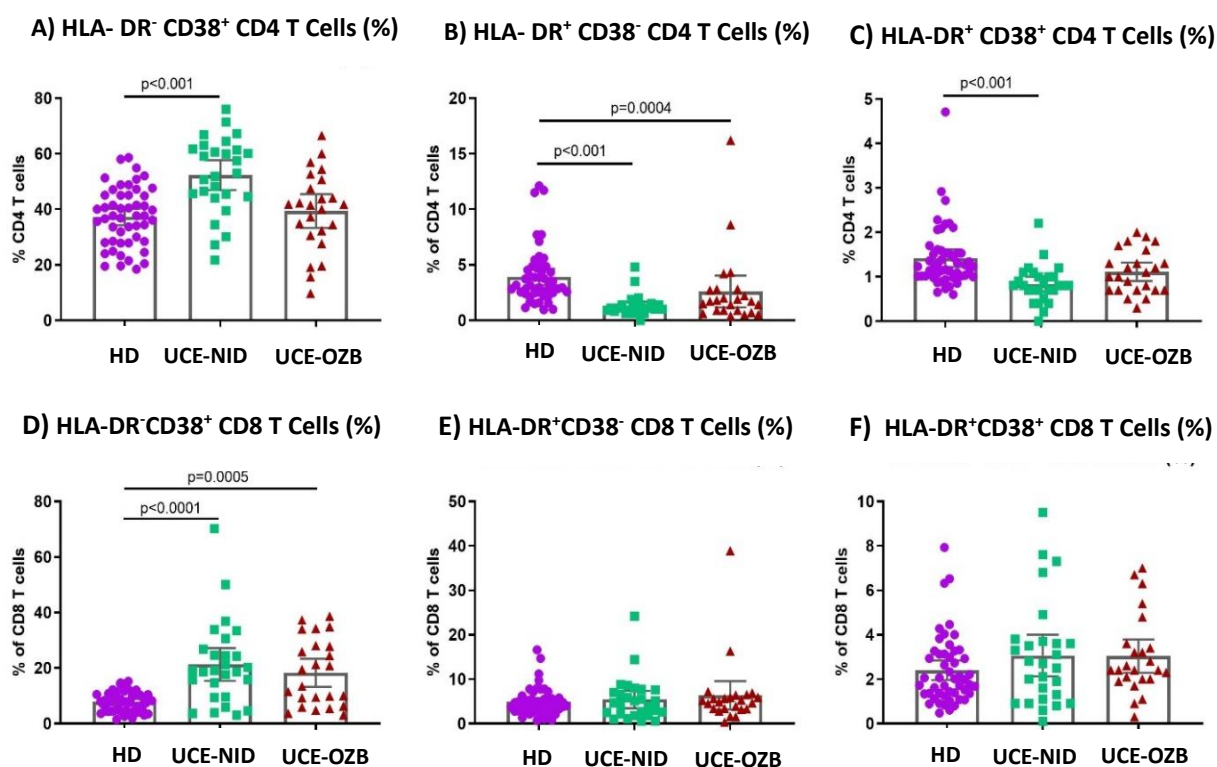


Figura 15: Adaptada de C.López *et al* (172). Diferencias en el porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ expresando CD38 y HLA-DR en sangre periférica de pacientes con UCE en tratamiento con omalizumab a los 6 meses en comparación con aquellos tratados con antihistamínicos o el grupo de controles sanos. Porcentajes de (A) HLA-DR⁻CD38⁺ (B) HLA-DR⁺CD38⁻ (C) HLA-DR⁺CD38⁺ (D) HLA-DR⁻CD38⁺ (E) HLA-DR⁺CD38⁻ (F) HLA-DR⁺CD38⁺ en sangre periférica de pacientes HD, UCE-NID y UCE-OZB. UCE, urticaria crónica espontánea; HD controles sanos (n=50); UCE-NID, tratamiento con antihistaminicos (n=27); UCE-OZB, tratamiento con omalizumab (n =24). Se consideró significativa una p<0,05.

Correlación con marcadores inflamatorios y positividad del TAB indirecto

Se evaluó la posible correlación entre los marcadores inflamatorios, la presencia de autoanticuerpos y la positividad de TAB indirecto con las subpoblaciones de linfocitos T. No se identificó ninguna asociación significativa entre estas variables.

6.1.5 OMALIZUMAB Y SUS EFECTOS EN LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS

Para evaluar los cambios inducidos por el tratamiento con omalizumab, se analizaron las subpoblaciones de linfocitos T en un subgrupo de pacientes con UCE, comparando los valores basales, previos al inicio de la terapia (T0), con los obtenidos a los 6 meses (T6). La cohorte analizada incluyó un total de 38 pacientes, de los cuales 14 fueron evaluados antes de iniciar el tratamiento y 24 tras seis meses de iniciar el tratamiento.

Antes del tratamiento (T0), los pacientes presentaron porcentajes elevados de células T CD8⁺ naïve (41,2 [10,7-54,5] vs 13,4 [6,5-48,2] %, $p=0,024$) y células T CD8⁺ totales (25,45 [16,8-41,4] vs 22,15 [13,1-40,4]%, $p=0,034$) (**Figura 16**).

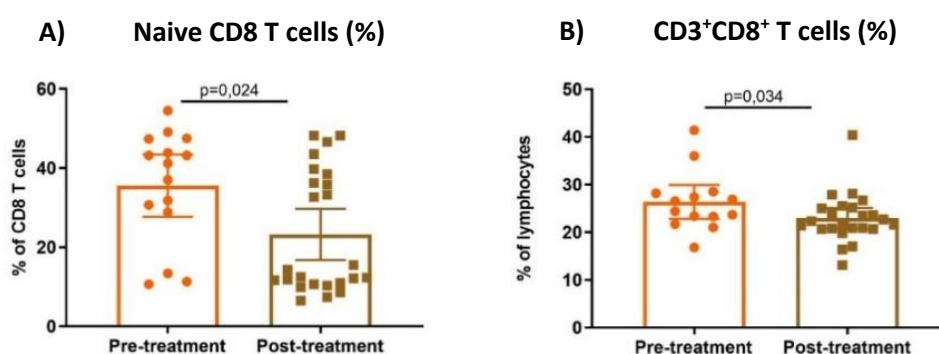


Figura 16: Diferencias en las subpoblaciones CD8⁺ antes y después de iniciar el tratamiento con omalizumab en pacientes con UCE. Porcentajes de (A) CD8⁺ naïve (CD3⁺CD8⁺CD27⁺CCR7⁺CD45RA⁺) y (B) CD8⁺ total en sangre periférica antes (n=14) y 6 meses después del tratamiento (n=24) con omalizumab. Se consideró significativa una $p<0,05$. UCE: urticaria crónica espontánea.

En cuanto a las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas, se evidenció una tendencia creciente en las células T CD4⁺ activadas HLA DR⁺CD38⁺ y en las subpoblaciones de Th1 memoria efectora y Th2 memoria central en los pacientes después de recibir tratamiento con omalizumab (**Figura 17**).

Finalmente, se evaluó la evolución de las subpoblaciones de linfocitos T en 9 pacientes seleccionados, comparando sus valores basales, previos al inicio del tratamiento, con los obtenidos a los 6 meses, permitiendo observar directamente los cambios individuales inducidos por el tratamiento con omalizumab. Aunque no se identificaron diferencias significativas, probablemente debido al tamaño de la muestra, se observó una tendencia decreciente de las células $CD4^+ HLA-DR^+CD38^-$ y un aumento de las células central y efectoras Th1, así como células $CD4^+$ activadas ($HLA-DR^+CD38^+$) (Figura 18).

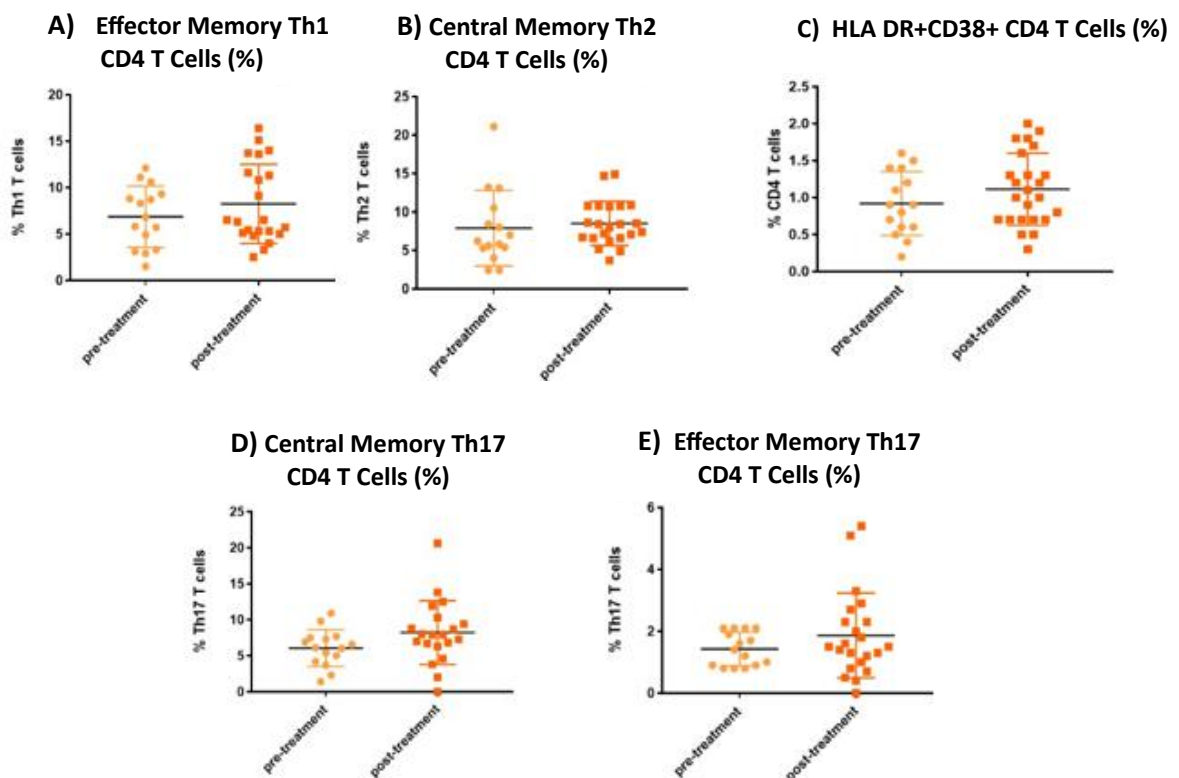


Figura 17: Diferencias en las subpoblaciones T helper antes y después de iniciar el tratamiento con omalizumab en pacientes con UCE. Porcentajes de **(A)** Th1 memoria efectora (EM) ($CD3^+CD4^+CCR7^+CD45RA^-CXCR3^+CCR6^-$), **(B)** Th2 memoria central (CM) ($CD3^+CD4^+CCR7^+CD45RA^-CXCR3^-CCR6^-$), **(C)** $CD4^+$ activadas ($CD3^+CD4^+HLA-DR^+CD38^+$), **(D)** Th 17 memoria central (CM) ($CD3^+CD4^+CCR7^+CD45RA^-CXCR3^-CCR6^+$), **(E)** Th 17 memoria efectora ($CD3^+CD4^+CCR7^+CD45RA^-CXCR3^+CCR6^+$) en sangre periférica de pacientes antes ($n=14$) y 6 meses después ($n=24$) de tratamiento con omalizumab. UCE: urticaria crónica espontánea.

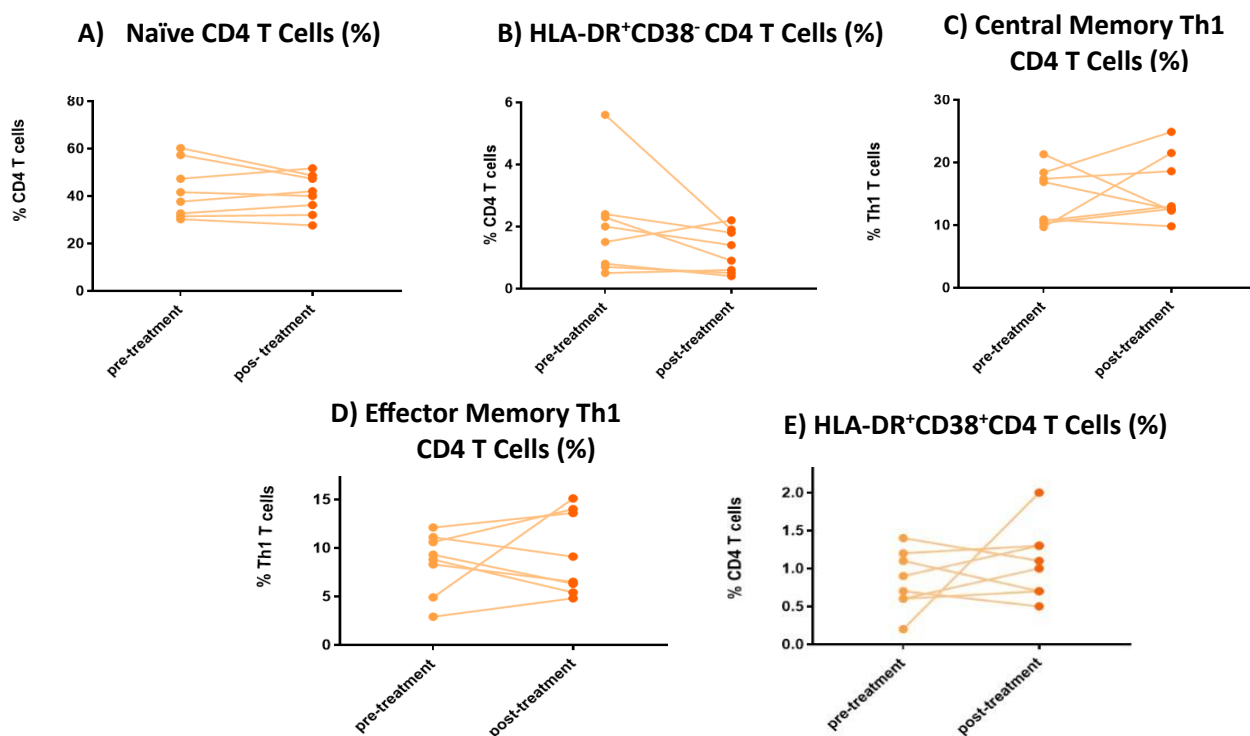


Figura 18: Diferencias en las subpoblaciones linfocitarias en pacientes con UCE antes y después del tratamiento con omalizumab (N=9). Porcentajes de **(A)** CD4 naïve (CD3⁺CD4⁺CD27⁺CCR7⁺CD45RA⁺), **(B)** CD4 activadas (CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺CD38⁻), **(C)** Th1 Memoria central (CM) (CD3⁺CD4⁺CCR7⁺CD45RA⁻CXCR3⁺CCR6⁻), **(D)** Th1 memoria efectora (EM) (CD3⁺CD4⁺CCR7⁺CD45RA⁻CXCR3⁺CCR6⁺), **(E)** CD4 activadas (CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺CD38⁺) en sangre periferia en pacientes antes y 6 meses después de tratamiento con omalizumab. UCE: urticaria crónica espontánea.

Todos los resultados del apartado de urticaria crónica han sido publicados previamente (172) y se incluye el artículo completo como Anexo I.

6.2 COHORTE ASMA GRAVE

6.2.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE ASMA

La **Tabla 15** presenta las características clínicas registradas en el momento de la inclusión en el estudio de los pacientes diagnosticados de asma grave alérgica en tratamiento con omalizumab, en comparación con la cohorte de asma grave sin tratamiento con omalizumab y asma leve.

En la cohorte de **asma grave en tratamiento con omalizumab (AG-OZB) (n=26)**, la mayoría de los pacientes eran mujeres (n=14; 54%), diagnosticadas de asma en edad adulta y sin presentar antecedentes familiares relevantes.

En cuanto a la sensibilización a alérgenos, la mayoría de los pacientes presentaron positividad frente a alérgenos inhalados, siendo los más comunes los ácaros del polvo, los epitelios y ciertos árboles como *Alternaria* y *Artemisa*.

En cuanto al recuento de eosinófilos y basófilos, se obtuvieron valores dentro de la normalidad. En relación con las variables de espirometría, se obtuvo un valor medio de FeNO de 41,46 ppb, un FVC de 93%, un FEV1 medio de 83% y una PBD positiva en 11 pacientes.

En comparación con las demás cohortes estudiadas, la **cohorte de asma grave alérgica sin tratamiento con anti-IgE (AG-SA) (n=40)** presentó un recuento de basófilos por encima de los valores de referencia en el 39% de los casos. De forma similar, el 5% de estos pacientes mostraron eosinofilia periférica. En cuanto a los niveles de IgE total, se obtuvieron valores de 337 [19,3-5000] kU/L, ligeramente inferiores a los esperados para esta categoría. Según los resultados del cuestionario ACT, se obtuvo un valor medio de 19,5, indicando un asma parcialmente controlada en la mayoría de los pacientes.

Por otro lado, en la **cohorte de pacientes con asma leve a moderada (AG-MA) (n=18)**, la mediana de IgE total fue de 222[35-2798] kU/L y los recuentos de eosinófilos y basófilos permanecieron dentro de los rangos considerados normales para esta condición. En este grupo, el 66% de los pacientes obtuvo una puntuación superior a 20 en el cuestionario ACT, lo que indica un buen control de la enfermedad.

6.2.2 MARCADORES SÉRICOS

Los pacientes de las distintas cohortes de asma presentaron niveles séricos de IgE elevados, siendo la cohorte de asma grave en tratamiento con anti-IgE la que presentaba mayores niveles, mostrando una mediana de 365 [64-2881]kU/L.

En cuanto al resto de biomarcadores, la cohorte de asma grave en tratamiento con anti-IgE fue el grupo que presentó menores recuentos de eosinófilos y basófilos, acorde a la disminución de la sintomatología y mejoría de la enfermedad (**Tabla 15**).

Tabla 15: Características clínicas de los pacientes de las distintas cohortes de asma en el momento de la inclusión en el estudio.

Variable	AG-MA (n=18)	AG-SA (n=40)	AG-OZB (n=26)
Sexo	Femenino: 13 (72%)	Femenino: 36 (90%)	Femenino: 14 (54%)
Inicio asma	Edad adulta: 3(25%)	Edad adulta: 36 (90%)	Edad adulta: 21 (81%)
IgE total kU/L;Mediana,IQ	222[35-2798]	337 [19,3-5000]	365[64-2881]
Positividad para IgE específica a inhalantes	80% ácaros del polvo 61% epitelios 65% pólenes	50% ácaros del polvo 15% hongos 35% epitelios	69 % ácaros del polvo 42% epitelios 23% alternaria 19% parietaria
FeNO medio,	47,43 (n=7)	50,6 (n=35)	41,46ppb (n=17)
Puntuación ACT medio	20 (n=9)	19.5 (n=38)	17.14 (n=7)
FVC medio	101,42%(n=14)	-	93 % (n=19)
FEV1, medio	100,3% (n=14)	74,1 % (n=36)	83,5%(n=19)
PBD	-	-	42 %(n=11)
Recuento eosinófilos (10 ⁹ /L)	0,34	0,47	0,27 (0,0-0,5)
Recuentos basófilos (10 ⁹ /L)	0,0	0,0	0,05 (0,0-0,1)

AG-MA, asma leve; AG-SA, asma grave sin tratamiento con omalizumab; AG-OZB, asma grave en tratamiento con omalizumab.

6.2.3 PERFIL INMUNOLÓGICO

En el análisis de las subpoblaciones de linfocitos T y la caracterización del fenotipo inmunológico de los pacientes, se incluyó una cohorte de 26 pacientes en tratamiento con omalizumab durante más de un año. Además, se estudiaron 18 pacientes diagnosticados de asma leve moderada, controlada con corticoides o betas agonistas, y 34 pacientes diagnosticados de asma grave alérgica, cuyo control se mantenía mediante el uso de corticoesteroides.

Estos grupos fueron comparados con 50 individuos sanos como controles (ver metodología).

Todos los datos completos de los cambios tanto en porcentajes como en cifras absolutas de las distintas cohortes se presentan en las **tablas 16-19**.

Tabla 16: Cambios en los porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica en controles sanos vs pacientes con asma grave en tratamiento con omalizumab vs asma grave sin tratamiento con omalizumab.

Subpoblaciones	Parent	HD		AG-OZB		AG-SA		HD VS AG-OZB (p)	HD Vs AG-SA (p)	AG-SA VS AG-OZB (p)
Linfocitos T CD4+	T cells	61,3	[44-78,1]	46,1	[32-57,1]	44,95	[27,5-59,2]	<0,0001	<0,0001	>0,99
Linfocitos T CD4 naïve	T CD4	42	[15,7-70,7]	43,4	[28,2-63,3]	41,15	[0,7-73,9]	0,50	>0,9	0,464
CD4 memoria central	T CD4	39,95	[19,9-58,3]	34,2	[24-52,1]	29,65	[4,2-58,5]	0,74	0,0037	0,254
CD4 memoria efectora	T CD4	14,85	[1,2-29,1]	12,9	[7-22,9]	17,35	[3-52,8]	>0,9	0,53	0,15
CD4 TEMRA	T CD4	1,46	[0,7-28,8]	2,4	[0,3-13,9]	3,75	[0,8-46,2]	>0,9	0,0005	0,007
CD4 HLA-DR+CD38+	T CD4	1,23	[0,65-4,71]	1,6	[0,7-4,3]	1,25	[0,5-7,1]	0,09	>0,9	0,38
CD4 HLA-DR+CD38-	T CD4	3,07	[0,96-12,1]	2,9	[0,9-7,4]	0,9	[0,1-5,6]	>0,9	<0,0001	<0,0001
CD4 HLA-DR-CD38+	T CD4	37,7	[18,4-54,9]	34,7	[21,2-59,7]	24,05	[11,3-37,3]	>0,9	0,0006	0,054
Th1 memoria central	T CD4 CM	8,225	[0,79-14,3]	12,1	[8,2-18,7]	10,15	[0,2-24,9]	0,0003	0,11	0,21
Th1 memoria efectora	T CD4 EM	5,25	[0,15-17,9]	5,7	[3,3-15,7]	7,6	[0,7-29]	>0,9	0,022	0,351
Th2 memoria central	T CD4 CM	6,55	[0,22-13,8]	8,4	[4,7-14,9]	8,65	[1,1-18,4]	0,088	0,006	>0,99
Th2 memoria efectora	T CD4 EM	1,125	[0,11-10,8]	1,9	[0,8-5,7]	2,1	[0,6-34,5]	0,009	<0,0001	>0,99
Th17 memoria central	T CD4 CM	10,28	[0,46-17,7]	7,9	[4-15,6]	5,5	[0,6-14,9]	0,005	<0,0001	0,089
Th17 memoria efectora	T CD4 EM	2,3	[0,18-20,12]	1,6	[0,5-3,3]	1,85	[0,6-7,3]	0,009	0,286	0,54
Linfocitos T CD8+	T cells	31,45	[12,7-47,6]	26	[14,2-35,7]	23,7	[10,3-46,2]	0,011	<0,0001	>0,99
Linfocitos T CD8	T CD8	40,65	[14,6-70,7]	26,1	[6,4-62,9]	23,90	[1,7-59,4]	0,01	0,002	0,274
CD8 memoria central	T CD8	10,85	[0,1-33,8]	17,3	[7,7-42,6]	12,75	[0,9-27,6]	0,0005	0,317	0,098
CD8 memoria efectora	T CD8	17,75	[0,4-29,4]	17,8	[3,4-27,7]	23,7	[6-45,2]	>0,9	0,376	0,449
CD8 TEMRA	T CD8	29,7	[5,2-66,7]	34,5	[5-69,1]	35,7	[7,9-69,6]	0,46	0,192	>0,9
CD8 HLA- DR+CD38+	T CD8	2,005	[0,48-7,93]	4,4	[0,7-19,4]	1,5	[0,5-8,5]	<0,0001	0,795	<0,0001
CD8 HLA-DR+CD38-	T CD8	4,575	[0,7-9,74]	2,8	[0,3-24,5]	5,25	[1,3-17,2]	>0,9	0,841	0,216
CD8 HLA-DR-CD38+	T CD8	7.87	[1.52-14.3]	26.3	[1.8-66.4]	6.65	[2.5-23.8]	<0.0001	>0.9	<0.0001

Los valores se expresan como porcentajes (%), mediana y rango intercuartílico. HD: controles sanos; AG-OZB: pacientes en tratamiento con omalizumab; AG-SA: pacientes sin tratamiento con omalizumab; P <0,05 indica diferencia estadísticamente significativa entre grupos.

Tabla 17: Cambios en recuentos absolutos de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica de controles sano vs pacientes en tratamiento con omalizumab vs pacientes con asma grave en tratamiento con corticoides.

Subpoblaciones	Parent	HD		AG-OZB		AG-SA		HD VS AG-OZB (p)	HD Vs AG- SA (p)	AG-SA VS AG- OZB (p)
Linfocitos T CD4+	T cells	807,5	[323-1520]	723,5	[287-1954]	651,4	[259,9-1719,02]	>0,99	0,41	0,77
Linfocitos T CD4 naïve	T CD4	307,5	[92-682]	356,05	[130-983]	245,6	[7,69-911,08]	0,75	0,57	0,08
CD4 memoria central	T CD4	293,5	[13-813]	276,45	[75-834]	207,41	[20,8-558,9]	>0,9	0,002	0,059
CD4 memoria efectora	T CD4	130	[7-336]	95,54	[55-260]	111,63	[14,56-656,67]	>0,9	>0,9	>0,9
CD4 TEMRA	T CD4	12	[1-170]	15,80	[1,9-162,2]	26,98	[2,15-507,3]	>0,9	0,0036	0,0286
CD4 HLA-DR+CD38+	T CD4	12,5	[4-32]	12,5	[6-33]	7,9	[3,07-82,14]	>0,9	0,0276	0,077
CD4 HLA-DR+CD38-	T CD4	26	[7-155]	19,24	[8-48]	8,07	[4,99-27,6]	>0,9	<0,0001	<0,0001
CD4 HLA-DR-CD38+	T CD4	279,5	[120-776]	248	[123-673]	173,06	[30,4-87,2]	>0,9	<0,0001	0,0002
Th1 memoria central	T CD4 CM	67	[5-198]	93	[24-248]	70,86	[5,34-249,59]	0,0213	>0,9	0,086
Th1 memoria efectora	T CD4 EM	47	[1-176]	43,57	[29-177]	57,2	[7,9-77,70]	>0,9	0,44	>0,9
Th2 memoria central	T CD4 CM	50	[1-148]	63	[16-174]	55,09	[5,34-171,9]	0,29	0,90	>0,9
Th2 memoria efectora	T CD4 EM	10	[1-66]	13,71	[6,6-41,2]	15,6	[3,66-399,14]	0,0527	0,0052	>0,9
Th17 memoria central	T CD4 CM	83	[3-219]	61,49	[16-188]	37,67	[6,59-94,3]	0,09	<0,001	0,0128
Th17 memoria efectora	T CD4 EM	17,5	[2-168]	11,20	[5,47-28,36]	12,18	[3,60-69,91]	0,0161	0,095	>0,9
Linfocitos T CD8+	T cells	351,5	[134-1011]	435,9	[161,9-1229,3]	365,37	[111,55-955,79]	>0,9	>0,9	0,671
Linfocitos T CD8	T CD8	135,5	[31-543]	91	[23-423]	76,7	[7,57-464,03]	0,068	0,0002	0,670
CD8 memoria central	T CD8	43	[1-143]	68	[25-272]	49,12	[4,88-105,40]	0,0003	0,915	0,018
CD8 memoria efectora	T CD8	71,5	[1-229]	69,7	[19-227]	130,24	[32,8-364,86]	>0,9	<0,0001	0,0024
CD8 TEMRA	T CD8	133	[11-427]	150	[10-730]	130,1	[20,78-656,45]	0,73	>0,9	>0,9
CD8 HLA- DR+CD38+	T CD8	10,5	[1-489]	21,7	[5-82]	5,05	[2,25-48,35]]	0,07	0,007	<0,0001
CD8 HLA-DR+CD38-	T CD8	17	[1-86]	13	[2-301]	15,9	[6,34-111]	>0,9	>0,9	>0,9
CD8 HLA-DR-CD38+	T CD8	24,5	[5-119]	94	[10-720]	21,84	[6,44-157,96]	<0,0001	>0,9	<0,0001

Los valores se expresan como recuentos absolutos (cél/μl), mediana y rango intercuartílico. HD: controles sanos; AG-OZB: pacientes en tratamiento con omalizumab; AG-SA: pacientes sin tratamiento con omalizumab; P <0,05 indica diferencia estadísticamente significativa entre grupos.

Tabla 18: Cambios en los porcentajes en las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica en controles sanos vs pacientes en tratamiento con omalizumab vs asma leve.

Subpoblaciones	Parent	HD		AG-OZB		AG-MA		HD VS AG-OZB (p)	HD Vs AG-MA (p)	AG-MA VS AG-OZB (p)
Linfocitos T CD4+	T cells	61,3	[44-78,1]	46,1	[32-57,1]	42,2	[24,3-53,8]	<0,0001	<0,0001	>0,9
Linfocitos T CD4 naïve	T CD4	42	[15,7-70,7]	43,4	[28,2-63,3]	51,25	[24,7-69,9]	0,4639	0,153	>0,9
CD4 memoria central	T CD4	39,95	[19,9-58,3]	34,2	[24-52,1]	36,25	[19,9-63,9]	0,5615	>0,9	>0,9
CD4 memoria efectora	T CD4	14,85	[1,2-29,1]	12,9	[7-22,9]	8,05	[4,6-14,5]	>0,9	0,0006	0,021
CD4 TEMRA	T CD4	1,46	[0,7-28,8]	2,4	[0,3-13,9]	2,2	[0,2-17,1]	>0,9	>0,9	>0,9
CD4 HLA-DR+CD38+	T CD4	1,23	[0,65-4,71]	1,6	[0,7-4,1]	2,7	[0,6-12,5]	0,073	0,0017	0,602
CD4 HLA-DR+CD38-	T CD4	3,07	[0,96-12,1]	2,9	[0,9-7,4]	4,2	[0,5-14,2]	>0,9	>0,9	0,73
CD4 HLA-DR-CD38+	T CD4	37,7	[18,4-54,9]	34,7	[21,2-59,7]	49,2	[21,6-70,7]	>0,9	0,0032	0,0008
Th1 memoria central	T CD4 CM	8,225	[0,79-14,3]	12,1	[8,2-15,7]	8,3	[5,3-11,5]	0,0001	>0,9	0,0025
Th1 memoria efectora	T CD4 EM	5,25	[0,15-17,9]	5,7	[3,3-15,9]	3,15	[0,5-4,7]	0,921	0,0054	0,0010
Th2 memoria central	T CD4 CM	6,55	[0,22-13,8]	8,4	[4,7-14,9]	5,65	[3,4-25,4]	0,07	>0,9	0,062
Th2 memoria efectora	T CD4 EM	1,125	[0,11-10,8]	1,9	[0,8-5,7]	0,95	[0,1-6,8]	0,0086	>0,9	0,166
Th17 memoria central	T CD4 CM	10,28	[0,46-17,7]	7,9	[4-15,6]	9,2	[5,3-20,7]	0,0009	>0,9	0,072
Th17 memoria efectora	T CD4 EM	2,3	[0,18-20,12]	1,6	[0,5-3,5]	1,2	[0,3-5,4]	0,0144	0,0016	>0,9
Linfocitos T CD8+	T cells	31,45	[12,7-47,6]	26	[14,2-35,7]	22,25	[15,7-57,5]	0,0086	0,0012	>0,9
Linfocitos T CD8 naïve	T CD8	40,65	[14,6-70,7]	26,1	[6,4-62,9]	34,5	[6,4-60,7]	0,0056	0,557	0,593
CD8 memoria central	T CD8	10,85	[0,1-33,8]	17,3	[7,7-42,6]	5,9	[1,6-30,1]	0,0024	0,936	0,001
CD8 memoria efectora	T CD8	17,75	[0,4-29,4]	17,8	[3,4-27,7]	13,8	[2,8-39,2]	>0,9	>0,9	>0,9
CD8 TEMRA	T CD8	29,7	[5,2-66,7]	34,5	[5-68,6]	37,85	[20,8-52,4]	0,364	0,172	>0,9
CD8 DR+CD38+	T CD8	2,005	[0,48-7,93]	4,4	[0,7-19,4]	7,35	[1,7-36,5]	<0,0001	<0,0001	>0,9
CD8 DR+CD38-	T CD8	4,575	[0,7-9,74]	2,8	[0,3-20,9]	7,35	[0,6-42,9]	>0,9	0,22	0,067
CD8 DR-CD38+	T CD8	7,87	[1,52-14,3]	26,3	[1,8-66,4]	36,7	[11,3-59,3]	<0,0001	<0,0001	0,412

Los valores se expresan como porcentajes (%), mediana y rango intercuartílico. HD: controles sanos; AG-OZB: pacientes en tratamiento con omalizumab; AG-MA: pacientes con asma leve; P <0,05 indica diferencia estadísticamente significativa entre grupos.

Tabla 19: Cambios en recuentos absolutos de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica en controles sanos vs pacientes en tratamiento con omalizumab vs asma leve.

Subpoblaciones	Parent	HD		AG-OZB		AG-MA		HD VS AG-OZB (p)	HD VS AG- MA (p)	AG-MA VS AG-OZB (p)
Linfocitos T CD4+	T cells	807,5	[323-1520]	723,5	[287-1954]	729,5	[360,1-1263]	>0,9	>0,9	>0,9
Linfocitos T CD4	T CD4	307,5	[92-682]	356,05	[130-983]	340,5	[127,6-663,8]	0,935	>0,9	>0,9
CD4 memoria central	T CD4	293,5	[13-813]	276,45	[75-834]	274,9	[88,3-472,5]	>0,9	>0,9	>0,9
CD4 memoria central	T CD4	130	[7-336]	95,54	[55-260]	53,8	[14,6-183,1]	>0,9	0,0012	0,0132
CD4 TEMRA	T CD4	12	[1-170]	15,80	[1,9-162,2]	15,1	[0,7-206,4]	>0,9	>0,9	>0,9
CD4 DR+CD38+	T CD4	12,5	[4-32]	12,5	[6-33]	17,6	[4,25-157,9]	>0,9	0,22	0,33
CD4 DR+CD38-	T CD4	26	[7-155]	19,24	[8-48]	27,8	[4,2-81]	>0,9	>0,9	>0,9
CD4 DR-CD38+	T CD4	279,5	[120-776]	248	[123-673]	388,5	[147,1-678,9]	>0,9	0,34	0,25
Th1 memoria central	T CD4 CM	67	[5-198]	93	[24-248]	67,9	[19,18-261,47]	0,02	>0,9	0,08
Th1 memoria efectora	T CD4 EM	47	[1-176]	43,57	[29-177]	22,71	[12,7-48]	>0,9	0,0042	0,0028
Th2 memoria central	T CD4 CM	50	[1-148]	63	[16-174]	43,73	[14,7-112,94]	0,26	>0,9	0,20
Th2 memoria efectora	T CD4 EM	10	[1-66]	13,71	[6,6-41,2]	7,19	[1,12-85,89]	0,04	>0,9	0,13
Th17 memoria central	T CD4 CM	83	[3-219]	61,49	[16-188]	68,53	[27,87-146,65]	0,04	>0,9	0,66
Th17 memoria efectora	T CD4 EM	17,5	[2-168]	11,20	[5,47-28,36]	9,18	[4,34-18,1]	0,0212	0,0016	0,98
Linfocitos T CD8+	T cells	351,5	[134-1011]	435,9	[161,9-1229,3]	389,1	[175,3-1459,3]	>0,9	>0,9	>0,9
Linfocitos T CD8 naïve	T CD8	135,5	[31-543]	91	[23-423]	110,4	[18,9-467,3]	0,048	0,79	>0,9
CD8 memoria central	T CD8	43	[1-143]	68	[25-272]	20,2	[3-176,6]	0,0015	0,74	0,0005
CD8 memoria efectora	T CD8	71,5	[1-229]	69,7	[19-227]	69,4	[6,2-137,2]	>0,9	>0,9	>0,9
CD8 TEMRA	T CD8	133	[11-427]	150	[10-730]	131,3	[63,6-1190,8]	0,76	>0,9	>0,9
CD8 DR+CD38+	T CD8	10,5	[1-489]	21,7	[5-82]	36,8	[3,8-204,9]	0,045	0,0021	0,83
CD8 DR+CD38-	T CD8	17	[1-86]	13	[2-301]	29,4	[6,2-229,1]	>0,9	0,46	0,30
CD8 DR-CD38+	T CD8	24,5	[5-119]	94	[10-720]	146,9	[26,3-295,8]	<0,001	<0,001	0,98

Los valores se expresan como recuentos absolutos (cél/μl), mediana y rango intercuartílico. HD: controles sanos; AG-OZB: pacientes en tratamiento con omalizumab; AG-MA: pacientes con asma leve;

P <0,05 indica diferencia estadísticamente significativa entre grupos.

6.2.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS SUBPOBLACIONES T EN LAS COHORTES DE ASMA SIN TRATAMIENTO CON ANTI-IGÉ EN COMPARACIÓN CON COHORTE ASMA LEVE Y CONTROLES SANOS

Linfocitos T CD4⁺

Los pacientes diagnosticados de asma grave sin tratamiento con anti-IgE presentaron mayores porcentajes de células CD4⁺ memoria efectora en comparación con la cohorte de asma leve (17,35 [3-52,8] vs 8,05 [4,6-14,5]%, $p < 0,0001$). En comparación con los controles sanos, se observaron mayores valores de células CD4⁺ efectoras (3,75 [0,8-46,2] vs 1,46 [0,7-28,8]%; $p = 0,0005$) y una disminución de células CD4⁺ memoria central (29,65 [4,2-58,5] vs 39,95 [19,9-58,3]%; $p = 0,0037$) (Figura 19).

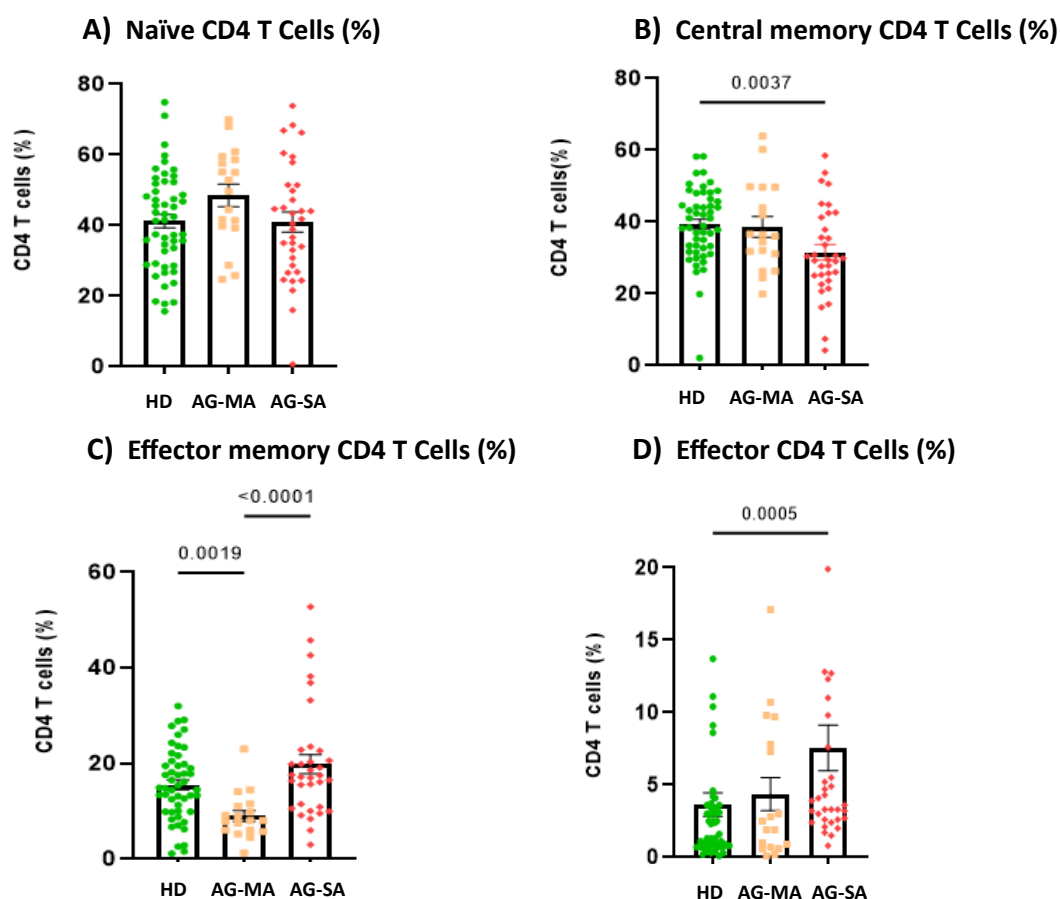


Figura 19: Diferencias en las subpoblaciones CD4⁺ en pacientes con asma grave alérgica sin tratamiento con omalizumab en comparación con pacientes con asma leve y controles sanos. Porcentajes de (A) naïve, (B) memoria central, (C) memoria efectora y (D) CD4 efectoras en sangre periférica en HD, AG-MA y AG-SA. HD (n=50) controles sanos; AG-MA (n=18) asma leve-moderado; AG-SA (n=34) asma severa sin tratamiento. Se consideró significativo un valor $p < 0,05$.

Subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ colaboradores

Los pacientes diagnosticados de asma grave sin tratamiento con anti-IgE presentaron porcentajes significativamente más elevados de Th2, tanto memoria central (8,65[1,1-18,4] vs (6,55[0,22-13,8]%; $p=0,0164$) como memoria efectora (2,1[0,6-34,5] vs 1,12 [0,11-10,8]%; $p=0,0003$), en comparación con controles sanos, lo cual es consistente con la respuesta inmunomediada en estos pacientes. Asimismo, se observaron porcentajes elevados de Th1 memoria efectora respecto a los controles sanos y a la cohorte de asma leve moderado, lo que sugiere un perfil mixto Th1/Th2. Finalmente, se evidenció una disminución de la subpoblación Th17 memoria central (**Figura 20**).

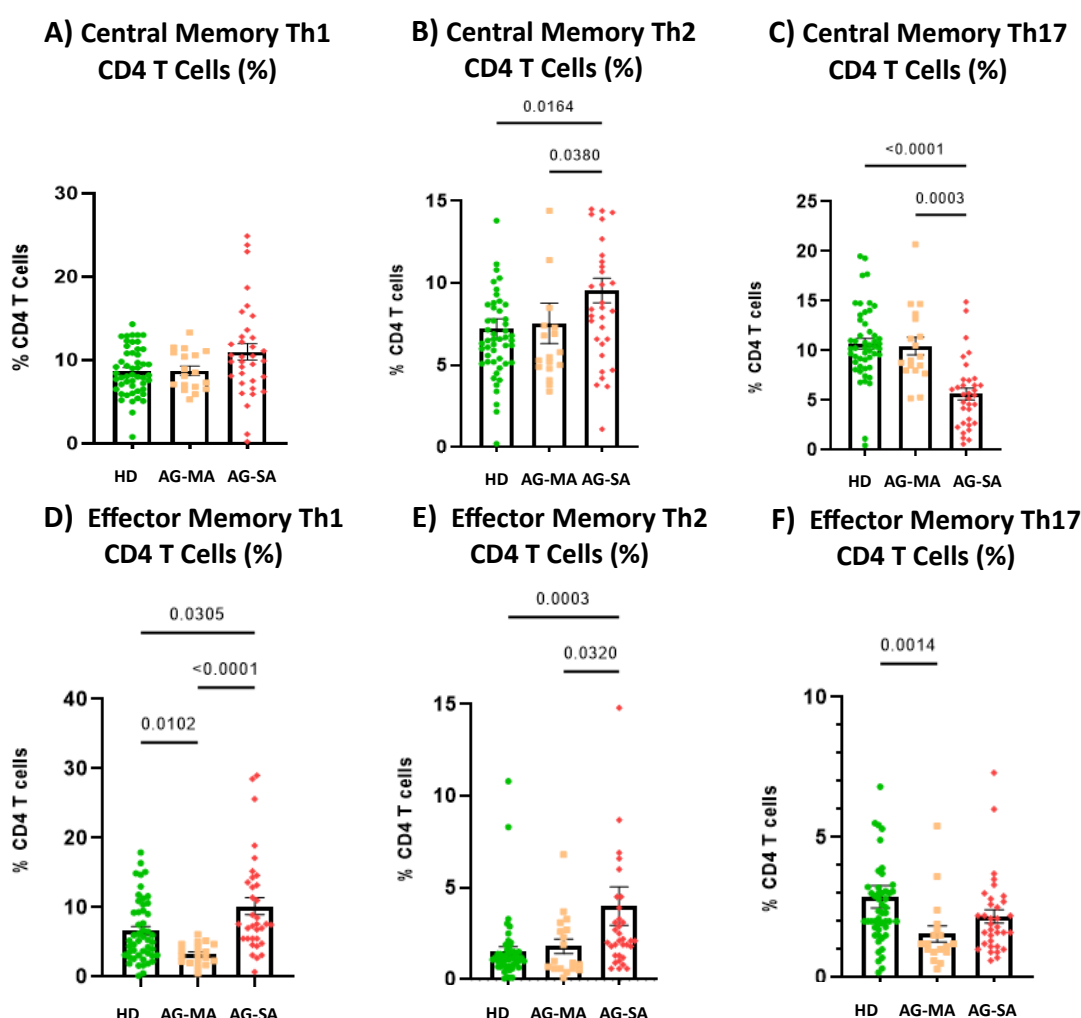


Figura 20: Diferencias en las subpoblaciones linfocitarias Th1, Th2 y Th17. Porcentajes de (A) Th1 memoria central, (B) Th2 memoria central, (C) Th17 memoria central, (D) Th1 memoria efectora, (E) Th2 memoria efectora y (F) Th17 memoria efectora en sangre periférica en pacientes HD, AG-MA y AG-SA. HD (n=50) controles sanos, AG-MA (n=18) asma leve moderado, AG-SA (n=34) asma severa. Se consideró significativo un valor $p<0,05$.

Linfocitos T CD8⁺

En las subpoblaciones T CD8⁺ se observaron porcentajes más disminuidos de células naïve en el grupo de asma grave respecto al grupo control (23,9 [10,3-46.2] vs 34,5[6,4-60,7]%; $p=0,0045$), sin alteraciones significativas en el resto de subpoblaciones CD8⁺ (**Figura 21**).

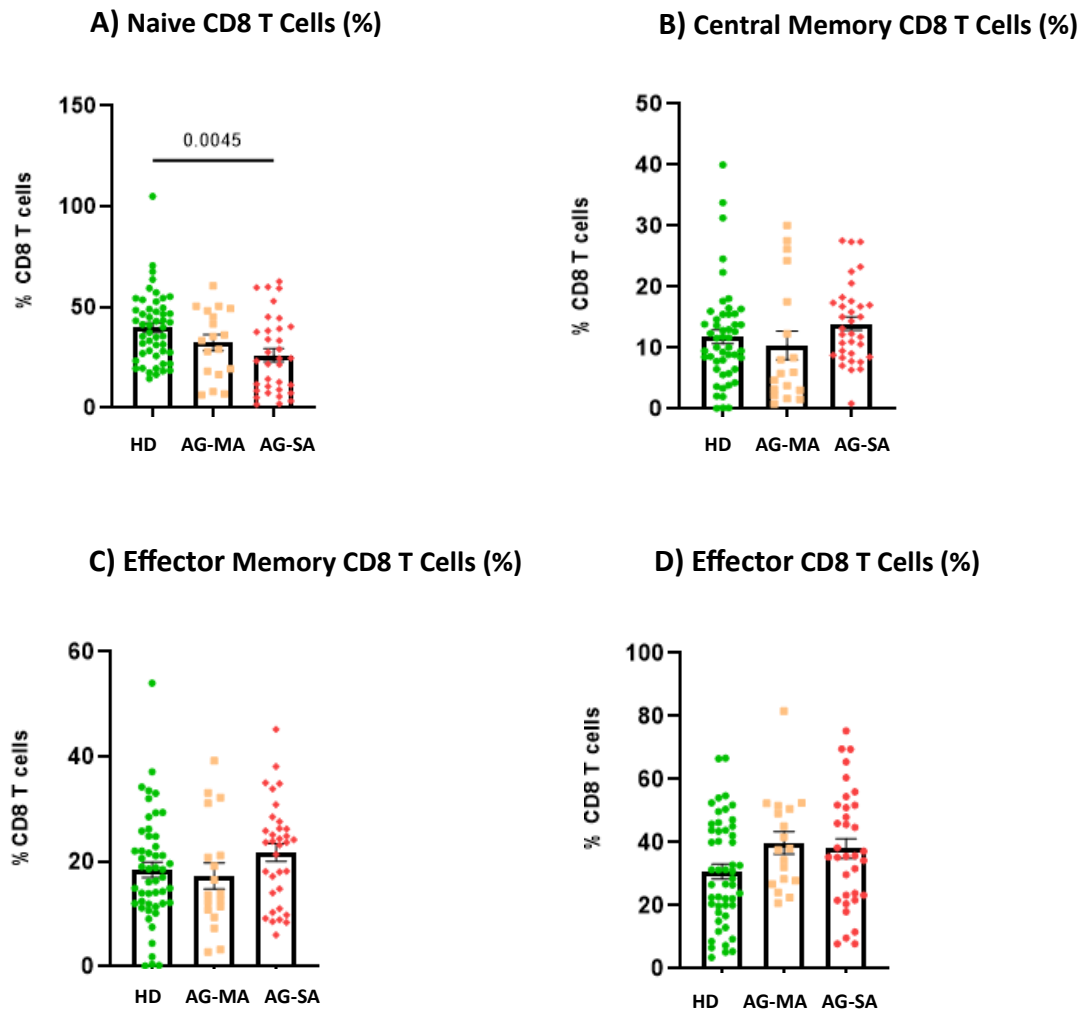
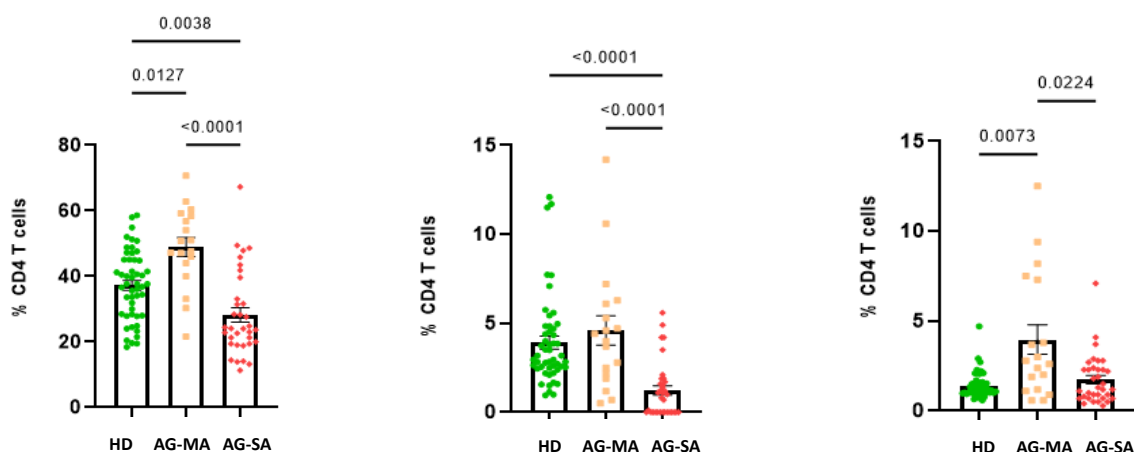


Figura 21: Diferencias en las subpoblaciones CD8⁺ en pacientes con asma grave alérgica sin tratamiento con omalizumab en comparación con los controles sanos y aquellos pacientes con asma leve moderado. Porcentajes de **(A)** CD8 naïve, **(B)** memoria central, **(C)** memoria efectora y **(D)** CD8 efectoras en sangre periférica en HD, AG-MA y AG-SA. HD (n=50) controles sanos, AG-MA (n=18) asma leve moderado, AG-SA (n=34) asma severa. Se consideró significativo un valor $p<0,05$.

Marcadores de activación de células T

En el análisis de los marcadores de activación HLA-DR y CD38, se observó que la cohorte de asma leve presentaba mayores porcentajes de células activadas, tanto CD4⁺ como CD8⁺ respecto al grupo de controles sanos y a la cohorte de asma grave (**Figura 22**).

A) HLA- DR⁻ CD38⁺ CD4 T Cells (%) B) HLA- DR⁺ CD38⁻ CD4 T Cells (%) C) HLA-DR⁺ CD38⁺ CD4 T Cells (%)



D) HLA-DR⁻CD38⁺ CD8 T Cells (%) E) HLA-DR⁺CD38⁻ CD8 T Cells (%) F) HLA-DR⁺CD38⁺ CD8 T Cells (%)

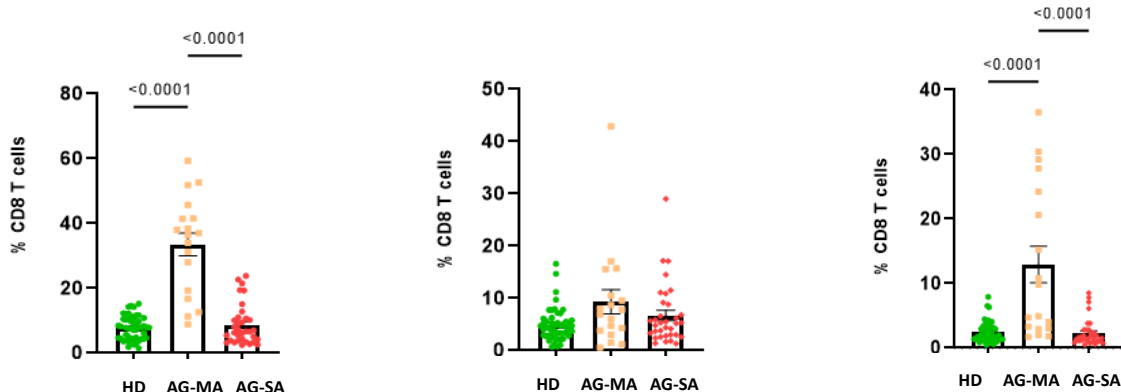


Figura 22: Diferencias en el porcentaje de células CD4 y CD8 expresando CD38 y HLA-DR en sangre periférica de pacientes asma grave alérgica sin tratamiento con omalizumab en comparación con los controles sanos y aquellos pacientes con asma leve moderado. Porcentajes de **(A)** HLA-DR⁺CD38⁻ **(B)** HLA-DR⁺CD38⁺ **(C)** HLA-DR⁻CD38⁺ en células CD4⁺ y **(D)** HLA-DR⁺CD38⁻ **(E)** HLA-DR⁺CD38⁺ **(F)** HLA-DR⁻CD38⁺ en células CD8⁺ en sangre periférica de pacientes HD, AG-MA y AG-SA. HD (n=50) controles sanos; AG-MA (n=18) asma leve moderado; AG- SA (n=34) asma severa. Se consideró significativo un valor p<0,05.

6.2.5 EFECTO DEL TRATAMIENTO SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO

6.2.5.1 Glucocorticoides

Con el objetivo de analizar en profundidad las alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias, se estratificó la cohorte de pacientes con asma grave según la dosis de corticoide recibida. Se establecieron dos grupos de tratamiento (800 mg (n=12) y 1600 mg vía inhalada (n=15), los cuales fueron comparados con el grupo de donantes sanos para evaluar posibles efectos dosis-dependientes del fármaco. Todos los datos de las diferencias entre las subpoblaciones linfocitarias entre estos dos grupos de cohortes se encuentran en la **tabla 20**.

Linfocitos T CD4⁺

Se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de cohortes en tratamiento con corticoides. En las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺, se encontraron elevados porcentajes de células CD4⁺ efectoras en ambos grupos comparado con el grupo control (dosis 800mg: 3,85[2,4-46,2] vs 1,46[0,1-28,8]%, p=0,0014; dosis 1600mg: 4,3[0,8-24,4] vs 1,46 [0,1-28,8]%, p=0,0031). Por el contrario, se detectaron porcentajes reducidos en algunas subpoblaciones activadas en comparación con los individuos sanos, sobre todo en la cohorte de mayor dosis (HLA-DR⁺CD38⁻: 0,7 [0,5-6] vs 3,07 [0,96-12,1]%, p=0,0012; HLA-DR⁻CD38⁺: 22,8 [13,2-43,5] vs 37,7 [19,6-48,8]%, p=0,0005 (**Figura 23**).

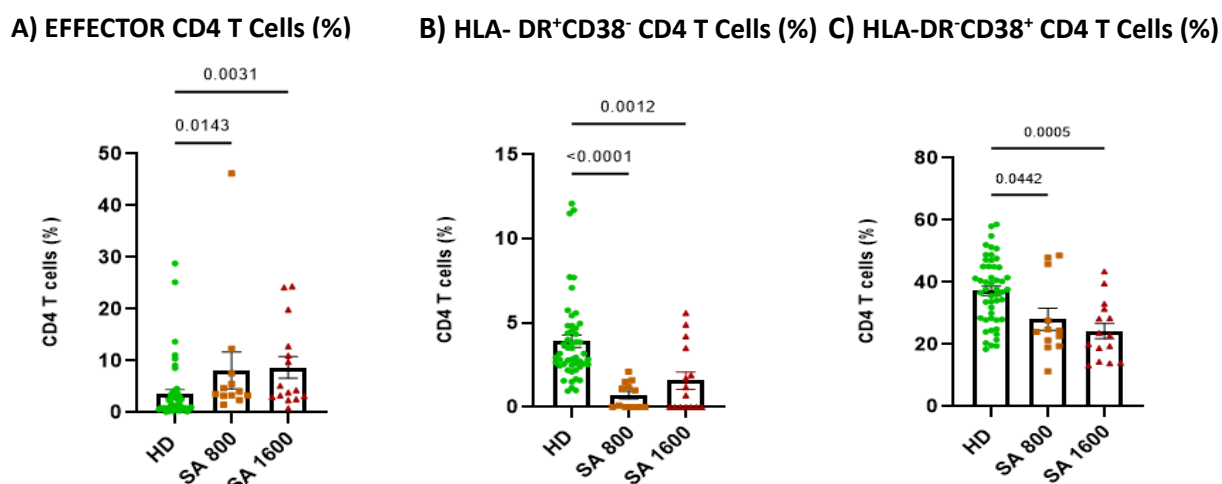


Figura 23: Diferencias en las subpoblaciones CD4⁺ activadas y efectoras en la cohorte de asma grave en comparación con grupo control. Porcentajes de (A) CD4 efectoras, (B) CD4 activadas (HLA-DR⁺CD38⁻) y (C) CD4 activadas (HLA-DR⁻CD38⁺) en sangre periférica en la cohorte de asma grave en comparación con grupo control. HD, (n=50) controles sanos; AG-SA 800 (asma grave 800 mg) (n=12); AG-SA 1600 (asma grave 1600 mg) (n=15). Se consideró significativo un valor p<0,05.

Tabla 20: Cambios en los porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias T en sangre periférica de controles sanos (HD) vs pacientes con asma leve con dosis de 800 mg (SA 800) vs pacientes con asma leves en tratamiento con dosis de 1600 mg (SA 1600).

Subpoblaciones	Parent	HD		AG-SA (800 mg)		AG-SA (1600mg)		HD VS SA 800 (p)	HD Vs SA 1600 (p)	SA 800 VS SA1600 (p)
Linfocitos TCD4 ⁺	T cells	61,3	[44-83,9]	46,55	[43-52,1]	44,4	[29,5-53,8]	<0,0001	<0,0001	<0,9
Linfocitos T CD4 naïve	T CD4	42	[17,8-74,9]	42,95	[0,7-49,8]	35	[16,73,9]	>0,9	0,946	>0,9
CD4 memoria central	T CD4	39,95	[19,9-58,3]	29,45	[7,4-53,7]	30,4	[4,2-50,6]	0,057	0,104	>0,9
CD4 memoria efectora	T CD4	14,85	[1,2-29,1]	17,55	[9,2-45,8]	19,2	[3-58,8]	0,375	0,834	>0,9
CD4 T EMRA	T CD4	1,46	[0,1-28,8]	3,85	[2,4-46,2]	4,3	[0,8-24,4]	0,0143	0,0031	>0,9
CD4 T HLA-DR+CD38+	T CD4	1,23	[0,6-4,71]	1,3	[0,3-4,1]	2,2	[0,4-7,1]	>0,9	0,903	>0,9
CD4 T HLA-DR+CD38-	T CD4	3,07	[0,96-12,1]	0,55	[0-1,6]	0,7	[0-5,6]	<0,0001	0,0012	0,665
CD4 T HLA-DR-CD38+	T CD4	37,7	[19,6-48,8]	24,2	[11,3-48,6]	22,8	[13,2-43,5]	0,04742	0,0005	>0,9
Th1 memoria central	T CD4 CM	8,22	[0,79-14,3]	10,2	[0,8-18,7]	9,5	[1,1-24,9]	0,308	0,698	>0,9
Th1 memoria efectora	T CD4 EM	5,25	[0,15-17,9]	8,05	[3,1-28,5]	8,9	[0,7-18,9]	0,0930	0,1399	>0,9
Th2 memoria central	T CD4 CM	6,55	[0,22-11,16]	9,3	[4,7-18,4]	9,9	[1,1-14,5]	0,0187	0,0918	>0,9
Th2 memoria efectora	T CD4 EM	1,125	[0,06-10,8]	2,35	[0,6-6,6]	1,9	[0,6-34,5]	0,0114	0,0606	>0,9
Th17 memoria central	T CD4 CM	10,28	[0,46-17,57]	4,9	[0,6-11,3]	6,1	[1-14,9]	0,0004	0,0005	>0,9
Th17 memoria efectora	T CD4 EM	2,3	[0,18-20,12]	2	[0,7-3,7]	1,6	[0,6-7,3]	>0,9	0,171	>0,9
Linfocitos T CD8 ⁺	T cells	31,45	[18,2-48,7]	20,6	[10,8-27,5]	24,4	[10,3-46,2]	<0,0001	0,0145	0,489
Linfocitos T CD8 naïve	T CD8	40,65	[14-105]	38,5	[3,4-59,8]	11,8	[1,7-33,4]	>0,9	<0,0001	0,0268
CD8 memoria central	T CD8	10,85	[0,2-33,8]	12,75	[0,9-22,5]	15,1	[7,8-27,6]	0,642	0,1662	>0,9
CD8 memoria efectora	T CD8	17,75	[0,2-37,1]	25,05	[9,8-33,9]	24,4	[6-38,1]	0,0931	0,843	0,995
CD8 T EMRA	T CD8	29,7	[3,5-66,5]	22,8	[9,7-54,5]	48	[29,8-69,6]	>0,9	0,00667	0,0231
CD8 T HLA-DR+CD38+	T CD8	2,05	[0,48-7,96]	1,3	[0,6-6,1]	1,5	[0,5-7,8]	0,1502	0,831	>0,9
CD8 T HLA-DR+CD38-	T CD8	4,57	[0,7-77,7]	2,8	[1,3-17,1]	6,6	[3-17,2]	0,565	0,01	0,0027
CD8 T HLA-DR-CD38+	T CD8	7,87	[1,92-14,6]	6,25	[3,2-19,3]	4,4	[2,5-19,4]	>0,9	0,389	>0,9

Los valores se expresan como porcentajes (%), mediana y rango intercuartílico. HD: controles sanos; AG-SA (800mg): pacientes en tratamiento con corticoides a dosis de 800mg; AG-SA (1600mg): pacientes en tratamiento con corticoides a dosis 1600mg; P <0,05 indica diferencia estadísticamente significativa entre grupos.

Subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ colaboradores

En relación con las subpoblaciones de linfocitos T colaboradores, se observaron porcentajes más elevados de las subpoblaciones Th2, tanto memoria central (9,3 [4,7-18,4] vs 6,55 [0,22-11,16]%, $p=0,0187$) como memoria efectora (2,35 [0,6-6,6] vs 1,123 [0,006-10,8]%, $p=0,00114$) respecto a los controles sanos (**Figura 24**).

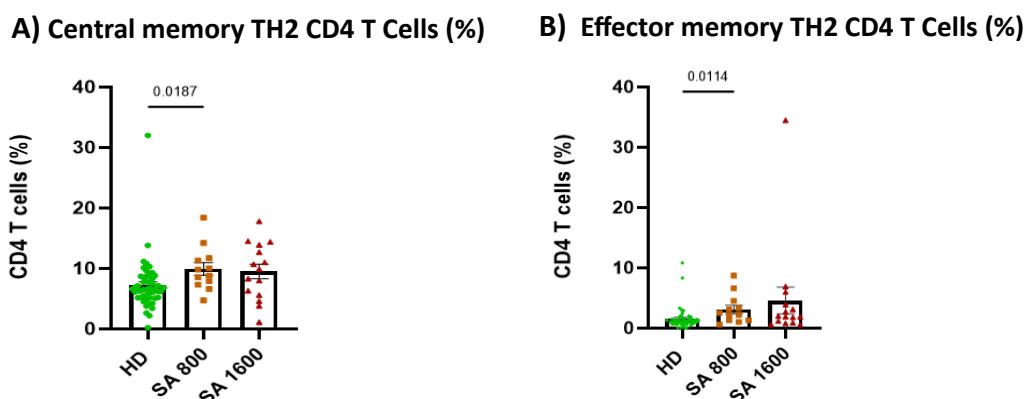


Figura 24: Diferencias en los porcentajes del perfil Th2 en la cohorte en tratamiento con distinta dosis de corticoides. Porcentajes de **(A)** Th2 memoria central y **(B)** Th2 memoria efectora en sangre periférica en la cohorte de asma grave en comparación con grupo control. HD, (n=50) controles sanos; AG-SA 800 (asma grave 800 mg) (n=12); AG-SA 1600(asma grave 1600 mg) (n=15). Se consideró estadísticamente significativo un valor $p<0.05$.

Linfocitos T CD8⁺

De manera similar a lo observado en las células CD4⁺, se detectaron porcentajes elevados de células CD8⁺ efectoras en la cohorte que recibió más dosis de corticoides, así como porcentajes reducidos de células CD8⁺ activadas y naïve en comparación con el grupo control (**Figura 25**).

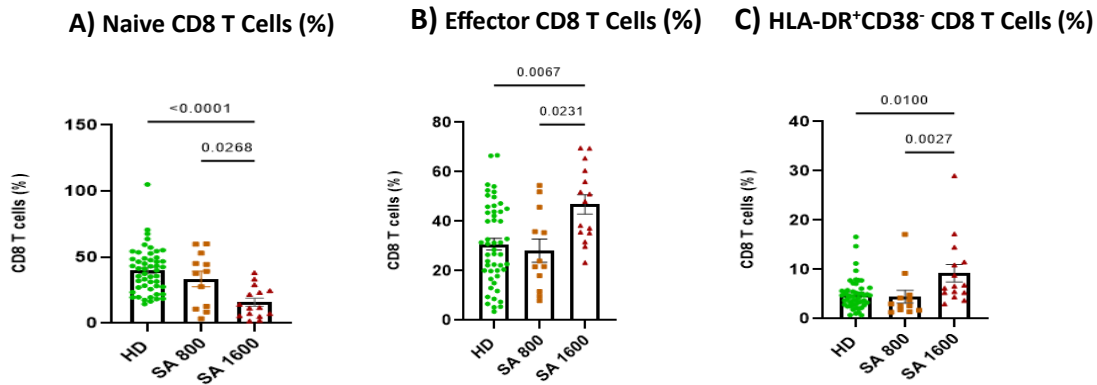


Figura 25: Diferencias en las subpoblaciones CD8⁺ entre la cohorte de asma grave en tratamiento con distinta dosis de corticoides. Porcentajes **(A)** CD8 naïve, **(B)** CD8 efectora, **(C)** CD8 activada (HLA-DR⁺CD38⁻) en sangre periférica en la cohorte de asma grave en comparación con grupo control. HD, (n=50) controles sanos, AG-SA 800 (asma grave 800 mg) (n=12), AG-SA 1600(asma grave 1600 mg) (n=15). Se consideró estadísticamente significativo un valor $p < 0,05$.

6.2.5.2 Omalizumab

Linfocitos T CD4⁺

En la cohorte de pacientes diagnosticados de asma grave alérgica en tratamiento con omalizumab, los porcentajes de subpoblaciones CD4⁺ fueron comparables al grupo control, lo que sugiere que el tratamiento puede contribuir a un posible restablecimiento de esta subpoblación de sangre periférica (**Figura 26**).

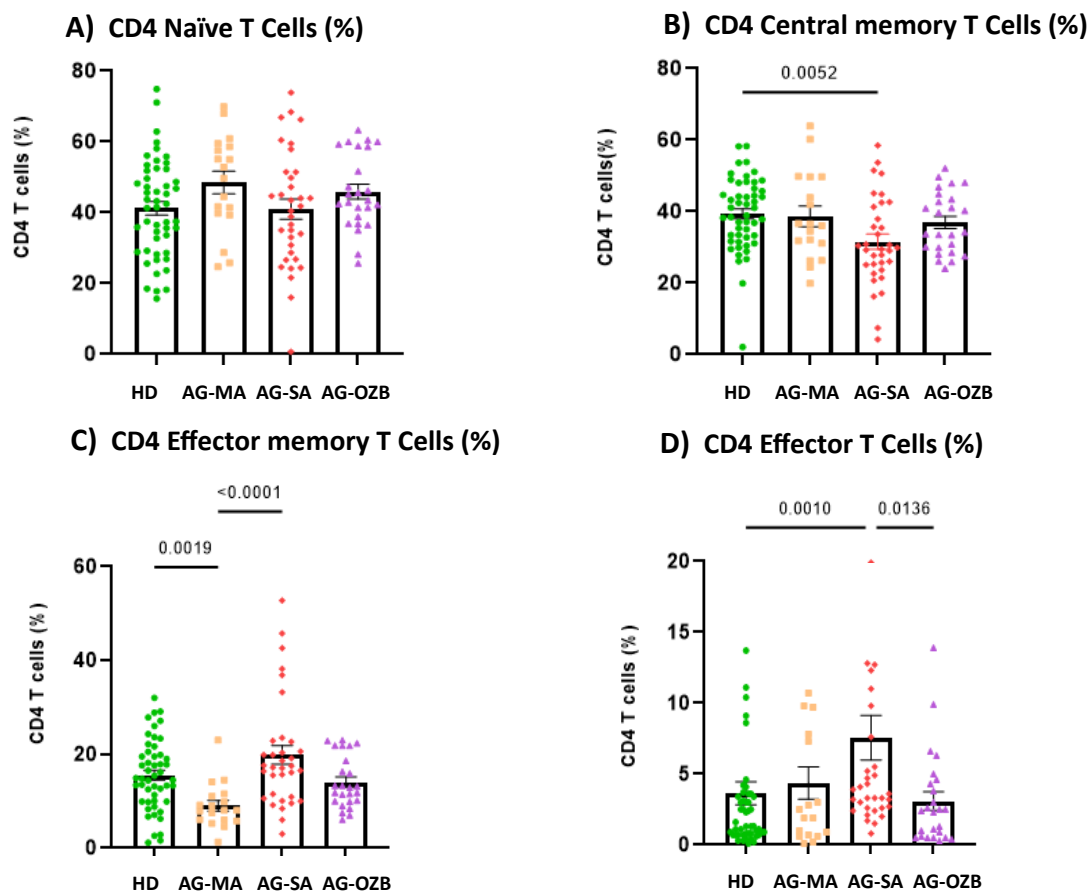


Figura 26: Diferencias en las subpoblaciones CD4⁺ en pacientes con asma grave alérgica en tratamiento con omalizumab en comparación con los controles sanos y con la cohorte de asma leve y asma grave sin omalizumab. Porcentajes de **(A)** naïve, **(B)** memoria central, **(C)** memoria efectora y **(D)** CD4 efectoras en sangre periférica en HD, AG-MA, AG-SA, AG-OZB. HD (n=50) controles sanos; AG-MA (n=18) asma leve-moderado; AG-SA (n=34) asma severa; AG-OZB (n=26) en tratamiento con omalizumab. Se consideró estadísticamente significativo un valor $p < 0,05$.

Linfocitos T CD8⁺:

Los pacientes tratados con omalizumab presentaron porcentajes más bajos de células naïve en comparación con los controles sanos (CD8⁺ naïve: 26,1 [6,4-62,9] vs 40,65 [14,6-70,7]%; $p=0.0211$) y porcentajes más altos de la subpoblación memoria central en comparación con los individuos sanos (CD8⁺ memoria central: 17,3 [7,7-42,6] vs 10.85 [0.1-33.8]%, $p=0.0025$) (**Figura 27**).

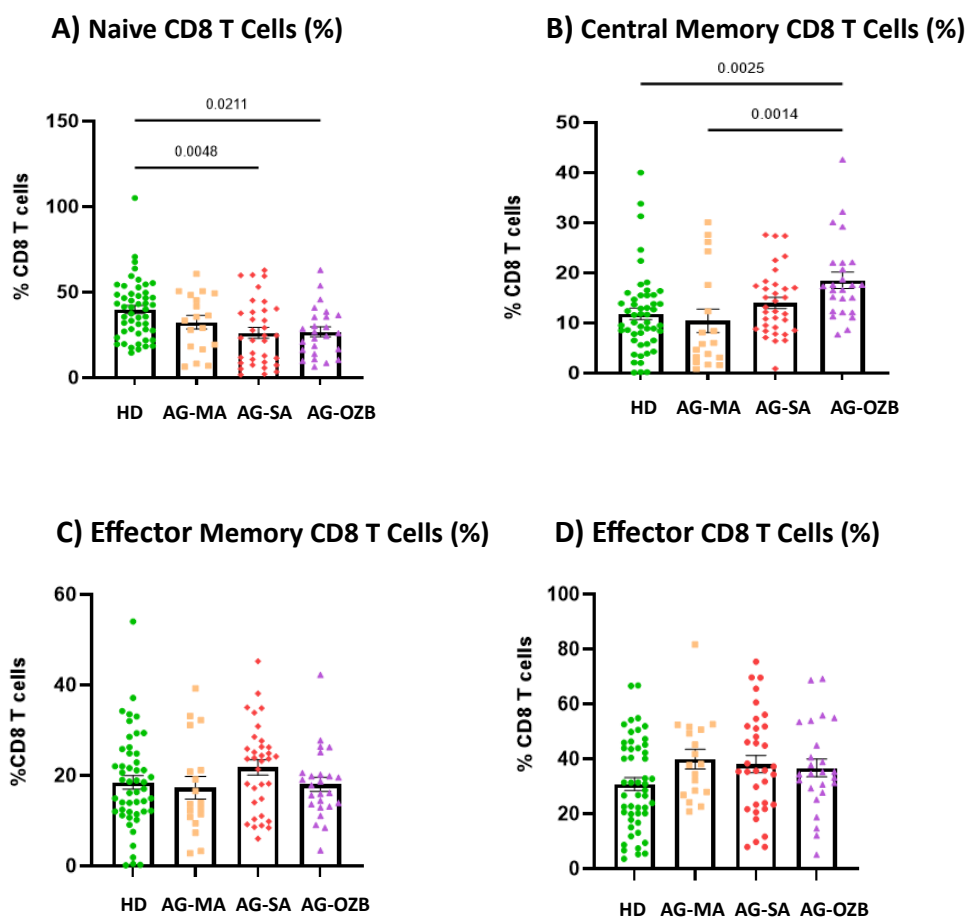


Figura 27: Diferencias en las subpoblaciones CD8⁺ en pacientes con asma grave alérgica en tratamiento con omalizumab en comparación con los controles sanos y con la cohorte de asma leve y asma grave sin omalizumab. Porcentajes de (A) CD8 totales, (B) naïve, (C) memoria central, (D) memoria efectora y (E) CD8 efectoras en sangre periférica en HD, AG-MA, AG-SA, AG-OZB. HD (n=50) controles sanos; AG-MA (n=18) asma leve-moderado; AG-SA (n=34) asma severa; AG-OZB (n=26) en tratamiento con omalizumab. Se considera estadísticamente significativo un valor $p<0,05$.

Subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ colaboradores:

Respecto a las subpoblaciones funcionales T, el tratamiento con omalizumab se asoció con un aumento de las células Th1 memoria central y efectora, así como en las células Th2 memoria efectora alcanzando valores comparables a los del grupo control. En contraste, se observó una disminución en las subpoblaciones Th17 memoria central y efectora (**Figura 28**).

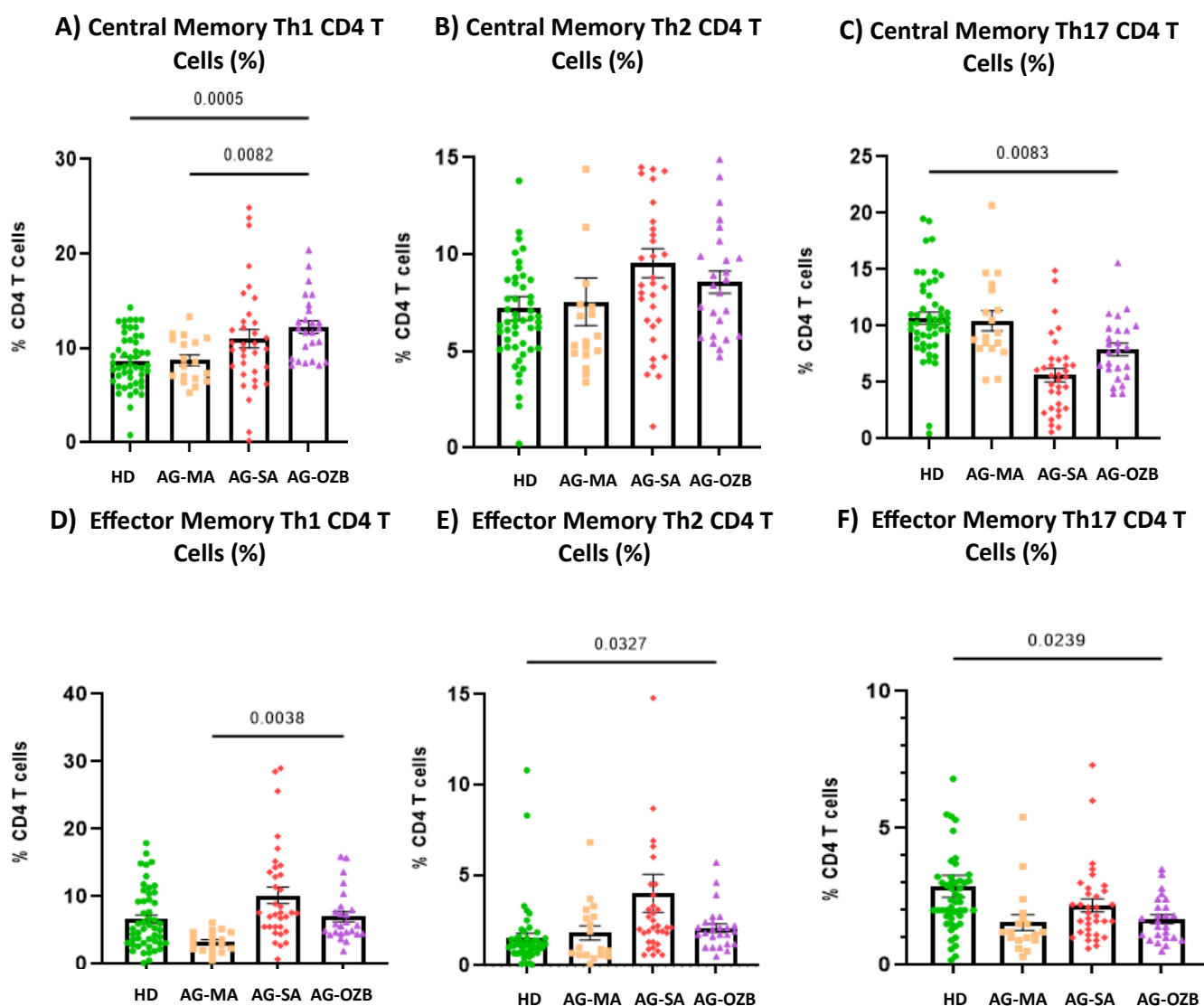


Figura 28: Diferencias en las subpoblaciones T helper en pacientes en tratamiento con omalizumab en comparación con los controles sanos y con la cohorte de asma leve y asma grave sin omalizumab. Porcentajes de (A) Th1 memoria central, (B) Th2 memoria central, (C) Th17 memoria central, (D) Th1 memoria efectora (E) Th2 memoria efectora, (F) Th17 memoria efectora en sangre periférica en pacientes HD, AG-MA, AG-SA y AG-OZB. HD (n=50) controles sanos; AG-MA (n=18) asma leve moderado, AG-SA (n=34) asma severa, AG-OZB (n=26) en tratamiento con omalizumab. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

Marcadores de activación de células T:

En el análisis de los marcadores de activación de células T, el tratamiento con omalizumab restableció los porcentajes de las tres subpoblaciones de células CD4⁺ con expresión del marcador HLA-DR y/o CD38, a valores comparables al grupo control, mientras que en el caso de las subpoblaciones CD8⁺, se obtuvieron cifras similares a las observadas en la cohorte de asma leve-moderado (**Figura 29**).

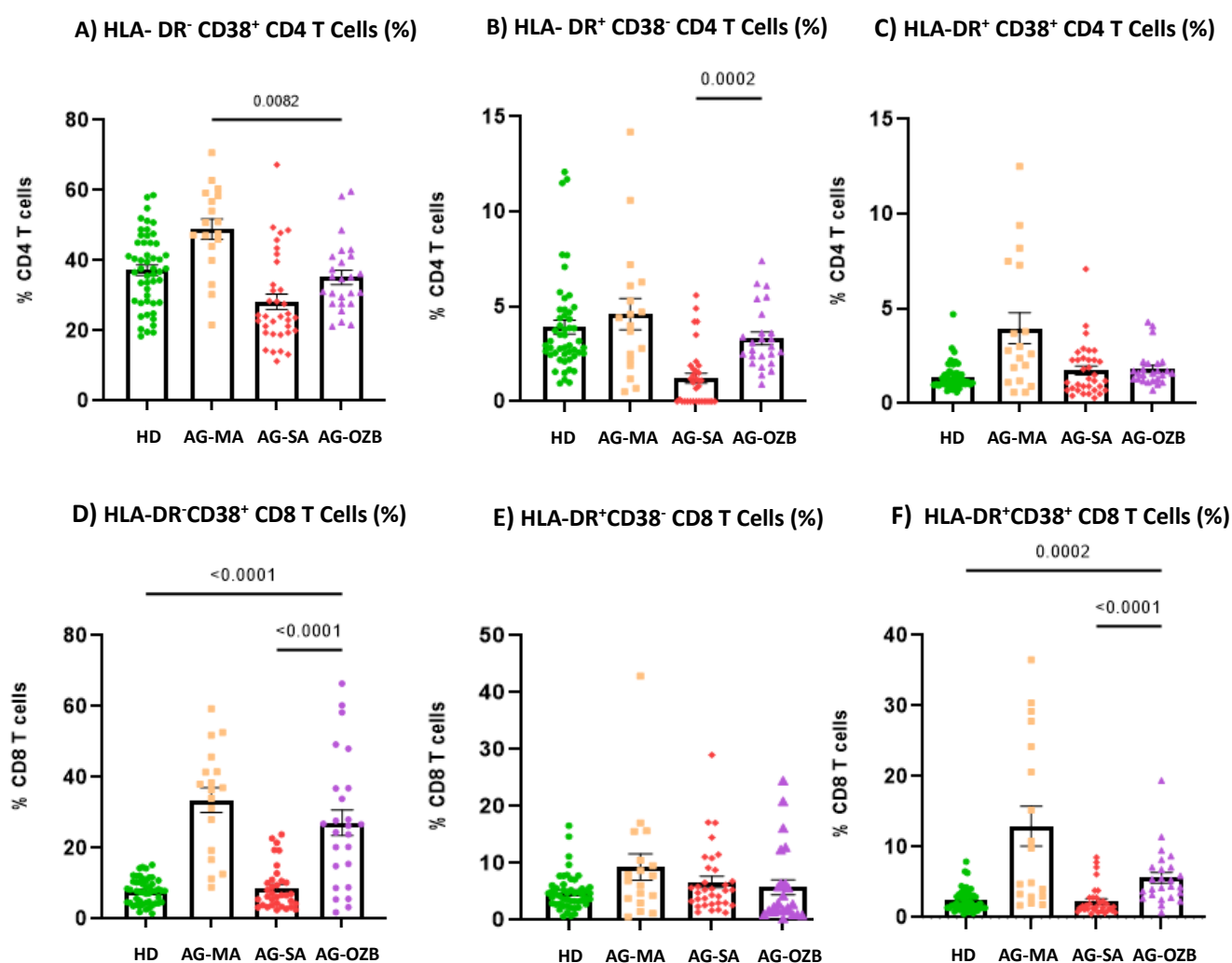


Figura 29: Diferencias en el porcentaje de expresión de CD38 y HLA-DR en células CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica en pacientes en tratamiento con omalizumab en comparación con los controles sanos y con la cohorte de asma leve y asma grave sin omalizumab. Porcentajes de **(A)** HLA-DR⁻CD38⁺ **(B)** HLA-DR⁺CD38⁻ **(C)** HLA-DR⁺CD38⁺ en la subpoblación CD4⁺ y **(D)** HLA-DR⁻CD38⁺ **(E)** HLA-DR⁺CD38⁻ **(F)** HLA-DR⁺CD38⁺ en la subpoblación CD8⁺ en sangre periférica de pacientes HD, AG-MA, AG-SA y AG-OZB. HD (n=50) controles sanos; AG-MA (n=18) asma leve moderado, AG-SA (n=34) asma severa, AG-OZB (n=26) en tratamiento con omalizumab. Se consideró estadísticamente significativo un valor p<0,05.

A continuación, se muestra una tabla comparativa de todas las alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias estudiadas en ambas patologías, urticaria crónica y asma grave alérgica (Tabla 21).

Tabla 21: Tabla comparativa de las alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias en pacientes en tratamiento con omalizumab en pacientes con urticaria crónica y asma grave alérgica versus el grupo de controles.

Subpoblación linfocitaria	Urticaria crónica	Asma grave
CD4 naïve	↓	=
CD4 efectora	=	=
CD4 memoria central	=	=
CD4 memoria efectora	=	=
Th1 memoria central	=	↑
Th2 memoria central	=	=
Th17 memoria central	↓	↓
Th1 memoria efectora	=	↑
Th2 memoria efectora	↑	↑
Th17 memoria efectora	↓	↓
CD4 HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	=	=
CD4 HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	=	=
CD4 HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	↓	=
CD8 naïve	↓	↓
CD8 efectora	↑	=
CD8 memoria central	=	↑
CD8 memoria efectora	↑	=
CD8 HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	=	Similar grupo asma leve
CD8 HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	=	Similar grupo asma leve
CD8 HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	=	Similar grupo asma leve

Porcentajes disminuidos: ↓ ; Porcentajes aumentados: ↑ ; Sin diferencias: =

- Todas las comparativas se han realizado respecto al grupo control.

7. DISCUSIÓN

El mecanismo de acción del omalizumab ha sido ampliamente caracterizado en la literatura como un mecanismo IgE dependiente. Sin embargo, su influencia sobre la inmunidad adaptativa, y en concreto, sobre las subpoblaciones de linfocitos T, no se ha dilucidado.

El principal objetivo de este trabajo fue investigar la inmunidad celular, proporcionando un análisis más detallado de estas subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y evaluando su potencial como biomarcadores de seguimiento y pronóstico, así como de respuesta al tratamiento en pacientes diagnosticados de urticaria crónica y de asma grave alérgica en tratamiento con anti-IgE. A continuación, se analizarán en detalle los efectos observados en cada patología, su relación con estudios previos y las posibles implicaciones futuras de estos resultados.

Características clínicas y respuesta al tratamiento en urticaria crónica espontánea

En la cohorte de pacientes con UCE incluida en este estudio, se observó un predominio del sexo femenino y una edad media superior a 40 años. Estos hallazgos son consistentes con lo descrito previamente en la literatura, incluyendo el estudio de *Gaig et al* (173) y el multicéntrico UCRESX (174), donde también se evidenció una mayor prevalencia en mujeres adultas. En conjunto, estos hallazgos confirman que la UCE es una patología predominantemente femenina en la edad adulta.

Respecto a la respuesta al tratamiento, se pudo evaluar de manera objetiva la mejoría clínica producida por el omalizumab con la escala UAS 7, observándose una reducción significativa en la escala una vez en tratamiento, indicando un control más efectivo de los síntomas y una menor actividad de la enfermedad.

Análisis y utilidad de biomarcadores séricos en urticaria crónica

En este contexto, se evaluaron biomarcadores séricos inespecíficos de inflamación y activación sistémica, como la VSG, el DD y la PCR, con el objetivo de valorar su posible utilidad en el seguimiento de pacientes con UCE. En nuestra cohorte se observó una disminución del DD y un leve incremento de la PCR y la VSG en comparación con la cohorte sin tratamiento con anti-IgE. Sin embargo, la literatura muestra cierta controversia respecto a la utilidad de estos parámetros como biomarcadores de seguimiento y pronóstico en pacientes tratados con omalizumab.

Kolkhir et al (175) describieron una reducción significativa de los niveles de PCR y DD tras el tratamiento con omalizumab, lo que sugiere una mejoría de la actividad inflamatoria asociada a

la enfermedad. En la misma línea, Asero et al. (176) confirmaron estos hallazgos, relacionando la disminución del DD con una mejor respuesta al tratamiento.

No obstante, *Pedersen et al* (79) y *Tarkowski et al* (177) observaron una asociación entre la elevación de PCR, VSG y DD con la severidad de la enfermedad, pero no lograron demostrar su utilidad como biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento con omalizumab.

En resumen, si bien en la literatura existen resultados contradictorios respecto a la utilidad de estos parámetros como biomarcadores de pronóstico y seguimiento en pacientes con urticaria crónica en tratamiento con omalizumab, los hallazgos de nuestro estudio no aportan evidencia que respalde su aplicación en este contexto.

De forma complementaria, evaluamos la presencia de anticuerpos anti-tiroideos en estos pacientes, dado que se han descrito como posibles biomarcadores que apoyan la existencia de un componente autoinmunitario. Su detección no sólo respalda la hipótesis de la participación del sistema inmune en la fisiopatología de la UCE, sino que además podría aportar valor pronóstico y ser útil para analizar la respuesta al tratamiento (178). Según lo reportado en la literatura, los anticuerpos anti-TPO son los que muestran la asociación más consistente con la urticaria crónica. Su presencia se ha vinculado con un riesgo entre 5-7 veces mayor de detectarlos en pacientes con UCE (179). Sin embargo, también se ha detectado positividad frente a anticuerpos antitiroideos en aquellos pacientes en tratamiento con omalizumab. En el estudio de *Aktaş ÖÖ et al* (180), asociaron la positividad frente a Tg con la falta de respuesta a omalizumab, mientras que *Asero et al* (181), no demostraron esta correlación, concluyendo que la autoinmunidad tiroidea por sí sola no predice la respuesta al tratamiento.

En nuestra cohorte, se evidenció positividad frente a estos anticuerpos en el 16% de los pacientes, no mostrando relevancia clínica ni relación con la respuesta al tratamiento. Estos resultados sugieren que, a pesar de su detección, en este contexto, los anticuerpos anti-tiroideos no son de utilidad como biomarcador de respuesta al tratamiento.

Dado el componente autoinmunitario implicado en la fisiopatología de la UCE, también se identificaron enfermedades autoinmunes concomitantes como la diabetes tipo 1 y la psoriasis. En este sentido, *Kolkhir et al* (182) evidenciaron la presencia de patologías autoinmunitarias concomitantes en pacientes con urticaria crónica, siendo las más frecuentes la tiroiditis de Hashimoto y la anemia perniciosa, y en menor proporción el vitíligo, el hipertiroidismo autoinmunitario (enfermedad de Graves) y la psoriasis. Estos hallazgos son concordantes con los resultados obtenidos en nuestro estudio y ponen de manifiesto el mecanismo autoinmunitario subyacente en la UCE.

Por último, se evaluó el TAB indirecto como método de detección de autoanticuerpos anti-IgE en pacientes con urticaria crónica autoinmune, así como la posible correlación entre su positividad y la respuesta al tratamiento. En nuestro estudio, un 38% de pacientes presentaron un TAB positivo estando en tratamiento con anti-IgE (n=3). La literatura existente sobre este tema es controvertida. *Gericke et al* (183) y *Vasagar et al* (184) confirmaron en sus estudios que el TAB es una técnica válida para identificar pacientes con anticuerpos anti-IgE y anti-FcεRI y que su positividad se correlaciona con una mayor gravedad de la patología, pudiendo permitir la monitorización del tratamiento con omalizumab(183,184). Otros estudios han analizado la correlación entre la positividad del TAB con la respuesta al tratamiento con omalizumab, encontrándose resultados contradictorios. En el estudio llevado a cabo por *Serrano-Candelas et al* (185), no observaron ningún efecto del omalizumab sobre la inhibición de la desgranulación de mastocitos y basófilos en el suero de pacientes con urticaria crónica antes y después del tratamiento. Estos resultados están en concordancia con los publicados por otros autores (186). Sin embargo, *Rodríguez-Trabado et al* (187) monitorizaron el porcentaje de activación de basófilos en el TAB en un paciente en tratamiento con omalizumab, observando una reducción en la activación de los basófilos una vez iniciado el tratamiento. Estos hallazgos coinciden con estudios previos que han asociado la positividad del TAB con una respuesta tardía o parcial al tratamiento con omalizumab (79).

Los resultados obtenidos en nuestra cohorte no muestran correlación de la positividad del TAB con el efecto del tratamiento anti-IgE, indicando que en este grupo de pacientes la utilidad del TAB como marcador predictivo de eficacia terapéutica podría ser limitada.

En conjunto, la evaluación de los diferentes biomarcadores séricos en nuestra cohorte mostró resultados heterogéneos. Mientras que algunos parámetros, como el DD, demostraron utilidad en la práctica clínica para la evaluación y el seguimiento de los pacientes, otros, como el TAB o la presencia de anticuerpos antitiroideos, no resultaron útiles como biomarcadores de seguimiento ni como predictores de respuesta terapéutica en pacientes con urticaria crónica tratados con omalizumab. Estos resultados subrayan la necesidad de identificar biomarcadores séricos más específicos y con mayor valor predictivo para la monitorización del tratamiento con omalizumab.

Características clínicas de la cohorte de asma grave alérgica

En la cohorte de asma grave alérgica en tratamiento, al igual que en la de urticaria, se observó un predominio del sexo femenino y una edad media superior a los 40 años. Diversos estudios han descrito que el asma alérgica tiende a debutar y diagnosticarse de forma más temprana, en torno a los 30 años, mientras que el asma no alérgica suele manifestarse a una edad más tardía, entre los 40 y 50 años (188). En nuestra cohorte, el 81% de los casos fueron diagnosticados de asma en la edad adulta.

En relación con los marcadores utilizados para el seguimiento de la enfermedad, en la cohorte de asma grave en tratamiento con anti-IgE, se observó una función pulmonar mejorada, evaluada mediante espirometría, mostrando valores dentro del rango normal con una FVC del 93% (normalidad >80%) y un FEV1 del 83,5%, (normalidad >80%), lo que indica una función pulmonar preservada. La literatura recoge numerosos estudios que muestran mejoras significativas en FEV1 y FVC tras el inicio del tratamiento con omalizumab. En la mayoría de los casos, esta mejoría se mantiene a medio y largo plazo, evidenciando un efecto estable sobre la función pulmonar (85,189,190). Asimismo, diversos estudios han demostrado que el tratamiento con omalizumab mejora tanto la función pulmonar como el control clínico de la enfermedad. En un estudio observacional que evaluó la efectividad de omalizumab en pacientes con asma grave alérgica (191), se observaron mejoras significativas en la puntuación del ACT y en el FEV1 tras la administración del fármaco. De forma complementaria, el estudio FENOMA demostró un incremento en la puntuación del ACT junto con una reducción significativa de los niveles de FeNO, reflejando un mejor control inflamatorio y clínico del asma (192).

En nuestra cohorte, el valor medio de FeNO fue de 41,46 ppb (rango intermedio: 25–50) y la PDB del 42%. Estos resultados, junto con una puntuación media de ACT de 17, podrían indicar la presencia de hiperreactividad bronquial activa característica del asma alérgica, así como inflamación eosinofílica no controlada en algunos pacientes bajo tratamiento. En conjunto, los datos sugieren que, aunque omalizumab puede mejorar la función pulmonar y reducir la inflamación en pacientes con asma grave alérgica, en determinados casos persisten signos inflamatorios y síntomas clínicos, lo que podría ser indicativo de una respuesta parcial al tratamiento.

Análisis y utilidad de biomarcadores séricos en asma grave alérgica y su correlación con basófilos y eosinófilos

Con respecto a los biomarcadores séricos, se analizaron distintos parámetros, entre ellos la IgE frente a inhalantes. Se obtuvo positividad para la IgE a inhalantes, siendo los ácaros del polvo los predominantes en los tres grupos analizados, un hallazgo concordante con lo descrito en la literatura, donde se considera un posible factor de riesgo en pacientes asmáticos. (193,194).

Además, se evaluó la utilidad del recuento de eosinófilos y basófilos en el seguimiento del control del asma, encontrándose valores dentro del rango de la normalidad en los tres grupos de pacientes. La utilidad de los eosinófilos en sangre periférica continúa siendo controvertida. Se han publicado resultados contradictorios: algunos estudios los relacionan con una mejoría clínica tras el tratamiento con omalizumab cuando los recuentos son bajos (195), mientras que otros los asocian con una mayor probabilidad de exacerbaciones asmáticas (196). En el caso de los basófilos, la literatura señala una correlación positiva entre recuentos bajos y una mejor respuesta al tratamiento, junto con una reducción significativa en la liberación de histamina (197,198).

En nuestra cohorte, los valores obtenidos se situaron dentro del rango de la normalidad, sin que fuera posible establecer una relación con el efecto del tratamiento anti-IgE.

Inmunoglobulina E sérica: análisis trasversal en ambas patologías

La IgE es un marcador clave en la fisiopatología tanto del asma como de la urticaria crónica, dos enfermedades que comparten mecanismos inmunológicos relacionados con la hipersensibilidad de tipo I o alérgica. En ambas patologías, se ha demostrado la utilidad de la medición de los niveles séricos de IgE para predecir la respuesta al tratamiento frente a terapias dirigidas, como el omalizumab. En estudios publicados en pacientes con urticaria crónica, se evidenciaron que niveles elevados de IgE total se relacionan con una mayor probabilidad de respuesta favorable a omalizumab (199,200). En pacientes con asma grave alérgica, los niveles de IgE se han asociado tanto con la respuesta al tratamiento con omalizumab como con la dosis requerida, a pesar de que no todos los pacientes con IgE elevada responden de manera favorable (201,202). En nuestro estudio, ambos grupos tratados con omalizumab presentaron niveles más elevados de IgE total en comparación con las demás cohortes analizadas. Este aumento se debe a que el omalizumab forma complejos estables con la IgE libre, prolongando su vida media en suero de 2 a 26 días (203).

Además, se ha demostrado que el omalizumab puede desplazar la IgE previamente unida a sus receptores FcεRI en mastocitos y basófilos, lo que contribuye al incremento de IgE detectable en suero (204). Por el contrario, la IgE libre disminuye tras el inicio del tratamiento, lo que se traduce en una menor activación de células efectoras y en la reducción de los síntomas (205). Con el uso prolongado de omalizumab, se observa una tendencia progresiva a la disminución de IgE debido a la modulación de su producción endógena mediante la inhibición de receptores como FcεRII (CD23) en linfocitos B (206).

Estos hallazgos confirman la utilidad de la IgE como biomarcador de respuesta al tratamiento con anti-IgE.

Caracterización inmunofenotípica de pacientes con urticaria crónica espontánea

Con respecto a la participación de los linfocitos T en la patogenia de la UCE, en biopsias cutáneas de pacientes con urticaria crónica espontánea se ha descrito la presencia de infiltrados perivasculares no necrosantes, con predominio de linfocitos T CD4+ de los subtipos Th1, Th2 y Th17, así como de células CD4+ con expresión del marcador de activación HLA-DR (207–209).

En la sangre periférica de pacientes con UCE tratados con omalizumab, se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD4+ naïve, acompañado de una disminución tanto de la subpoblación de memoria central como de los linfocitos T CD4+ que expresan el marcador de activación HLA-DR. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de una posible migración de las células de memoria y/o activadas hacia el tejido afectado, especialmente las lesiones cutáneas, en concordancia con lo reportado en la literatura. Con el tratamiento, estos valores se restauraron, alcanzando porcentajes similares a los del grupo control. En conjunto, estos resultados, respaldados por diversos estudios clínicos, sugieren no solo una mejoría clínica, sino también una reducción significativa de las lesiones cutáneas (210,211).

Por su parte, la subpoblación Th17 desempeña un papel importante en la patogenia de la UCE, observándose mayores concentraciones de IL-17 en el suero de estos pacientes y un incremento de estos linfocitos en las lesiones cutáneas, lo que podría relacionarse con una mayor gravedad de la enfermedad (207). Estudios similares, como el de *Moy et al* (212), reportaron mayores porcentajes de las subpoblaciones Th2 y Th17 en biopsias de pacientes con UCE en comparación con controles sanos, confirmando un fenotipo inmunológico caracterizado por una respuesta predominante Th2, acompañada de la participación de la subpoblación Th17 en la modulación del proceso inflamatorio.

Nuestros resultados mostraron una disminución en los porcentajes de linfocitos Th17 en ambas cohortes de UCE (con y sin tratamiento con omalizumab), lo que sugiere una posible migración de estas células hacia las lesiones cutáneas y la ausencia de efecto del omalizumab sobre ellas, lo que impide su uso como marcador predictivo o de seguimiento de la enfermedad.

Por otro lado, los pacientes con UCE presentan un fenotipo inmunológico combinado Th1/Th2 (36,42). El tratamiento con omalizumab induce incrementos en el porcentaje y en el recuento de las subpoblaciones Th1 y Th2 de estos pacientes, que, en la mayoría de los casos, tienden a reestablecerse a porcentajes comparables a los del grupo control. Este proceso podría estar vinculado a la acción de las células dendríticas, que desempeñan un papel clave en la diferenciación y regulación de ambos perfiles inmunológicos. Se ha demostrado que el tratamiento con omalizumab reduce la expresión de los receptores FcεRI en la superficie de las células dendríticas, tanto en las células dendríticas tipo 1 (DC1), asociadas a la inducción de respuestas Th1, como en las células dendríticas tipo 2 (DC2), vinculadas al perfil Th2, lo que sugiere un papel regulador de estas células en la respuesta inmunológica de los pacientes bajo tratamiento (213).

Por último, en cuanto a linfocitos T CD8⁺, el conocimiento de su papel en el contexto de esta patología sigue siendo limitado. Estudios previos, como el llevado a cabo por *Prosty et al* (214), evidenciaron la presencia de linfocitos T CD8⁺ en piel no lesionada de pacientes con UCE (214), mientras que otras investigaciones los han vinculado con la producción de IFNλ1, sugiriendo que puedan tener un papel pro-inflamatorio en la enfermedad (215).

En nuestra cohorte en tratamiento con omalizumab, se observaron porcentajes reducidos de linfocitos T CD8⁺ naïve y un incremento de células efectoras, hallazgo que podría reflejar la capacidad del fármaco para estimular la diferenciación celular hacia una respuesta más activa.

Caracterización inmunofenotípica en pacientes con asma grave alérgica

El asma se caracteriza por ser una enfermedad alérgica predominante con una respuesta inmunitaria tipo 2, en donde las células Th2 e ILC2 juegan un papel importante, principalmente a través de la producción de interleucinas como IL-4, IL-5, IL-13 entre otras.

En nuestra cohorte de asma grave alérgica tratada con corticoides, se observó una predominancia del perfil Th2, característico de la enfermedad. Asimismo, se observaron porcentajes elevados de la subpoblación Th1 memoria efectora, lo que sugiere la existencia de un perfil mixto Th1/Th2 en este grupo de pacientes.

Otros autores han analizado las subpoblaciones de linfocitos T en pacientes con asma grave, encontrando perfiles Th1 y Th2 tanto en muestras de BAL como en sangre periférica (216,217).

El estudio de *Krug et al* (217), demostró que los pacientes asmáticos presentaban una mayor producción de IFN- γ en comparación con los controles sanos en el BAL, sin diferencias significativas en la producción de IL-4, reflejando una respuesta tipo Th1. En paralelo, estudios en modelos murinos evidenciaron que los linfocitos Th1 no logran neutralizar los efectos del perfil Th2 y, por el contrario, inducen una inflamación pulmonar más intensa (218). Estos hallazgos respaldan la coexistencia de ambas respuestas Th1 y Th2 en el contexto del asma (216).

En esta línea, diversos trabajos han señalado la relevancia de la respuesta Th1 en pacientes asmáticos, especialmente en aquellos resistentes a corticoides, quienes muestran una mayor proporción de linfocitos Th1 y un perfil más proinflamatorio. Esta polarización hacia la respuesta Th1 es característica de los fenotipos de asma neutrofílica y asma severa (219–221). Además, el uso de corticoides parece modular el fenotipo del asma, favoreciendo la evolución hacia perfiles de asma neutrofílica o eosinofílica, contribuyendo a la heterogeneidad clínica de la enfermedad (222).

Con el fin de analizar la influencia del tratamiento con corticoides en las subpoblaciones linfocitarias T en pacientes asmáticos con asma severa alérgica, realizamos un estudio comparativo entre dos cohortes que recibieron dosis diferentes de tratamiento de corticoides (800 y 1600 μ g vía inhalada). En nuestra cohorte, al comparar los dos grupos de pacientes, se observaron porcentajes significativamente elevados de subpoblaciones T efectoras, tanto CD4 $^{+}$ como CD8 $^{+}$, especialmente en el grupo tratado con mayor dosis de corticoides. En relación con las CD4 $^{+}$ efectoras, estudios realizados en modelos murinos de asma alérgica tratados con corticoides inhalados y sistémicos han demostrado una reducción significativa de estas subpoblaciones, tanto en sangre periférica como en tejido pulmonar (223).

En el contexto de las subpoblaciones CD8 $^{+}$, estudios como el de *Miyahara et al* (224) en modelos murinos, demostraron que los linfocitos T CD8 $^{+}$ efectores desempeñan un papel importante en la fisiopatología del asma alérgica ya que se correlacionaron con mayor inflamación eosinofílica, hiperreactividad bronquial y aumento de los niveles de IL-13 (224). Por su lado, *Ramonell et al* (225), demostraron que la subpoblación CD8 $^{+}$ TEMRA son productoras de IFN- γ , sugiriendo una respuesta proinflamatoria y, además, se correlacionan directamente con la duración del asma desde el inicio de los síntomas de la enfermedad (225).

Por tanto, estas células muestran una tendencia a acumularse con el tiempo en pacientes con asma grave, lo que sugiere que contribuyen a la persistencia y/o cronicidad de la inflamación pulmonar en estos pacientes (225).

Asimismo, se encontraron elevados recuentos celulares de otras células efectoras, los linfocitos T citotóxicos tipo -2 (Tc2) CD8⁺, caracterizadas por la producción de citocinas de tipo 2 y resistencia al tratamiento con corticoides, contribuyendo a la inflamación sistémica y a la perpetuación de los síntomas (226,227).

Nuestros resultados indican que los pacientes en tratamiento con corticoides presentan mayores porcentajes de subpoblaciones efectoras T CD8⁺, lo que se asocia con una mayor actividad de la enfermedad y con una resistencia más marcada al tratamiento.

En el análisis de los linfocitos T colaboradores de nuestra cohorte, los pacientes tratados con dosis bajas de corticoides presentaron porcentajes más elevados de las subpoblaciones Th2 en comparación con el grupo control. Sin embargo, estas diferencias no se observaron en el grupo tratado con dosis más altas de corticoides, cuyos porcentajes fueron similares a los del grupo control. Estos resultados podrían explicarse por un efecto dosis-dependiente del tratamiento. En el asma, el tratamiento con corticoides se inicia generalmente a dosis bajas para controlar la inflamación leve. En el caso de respuesta insuficiente, se incrementa la dosis con el fin de lograr una inhibición más completa de la respuesta Th2 y un mejor control de la enfermedad (228–230). *Bonsjak et al* (231), estudiaron en profundidad las distintas terapias y mecanismos de acción en pacientes con asma grave alérgica. En el caso de los glucocorticoides, describieron una inhibición de las citoquinas involucradas en la respuesta tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-13), disminuyendo la eosinofilia, la producción de IgE y la hiperreactividad bronquial, siendo un efecto dosis-dependiente (231). En línea con los resultados previamente reportados, nuestros datos muestran que, a dosis más elevadas, los corticoides son capaces de inhibir la respuesta Th2 de manera satisfactoria.

Con el objetivo de evaluar el efecto del fármaco anti-IgE sobre la modulación de las subpoblaciones linfocitarias, realizamos un análisis comparativo entre la cohorte tratada con anti-IgE y las cohortes de asma leve y severa en tratamiento con corticoides. En la cohorte en tratamiento con omalizumab, se observó una normalización en el porcentaje de las subpoblaciones T CD4⁺ así como una disminución en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ naïve y un incremento en el porcentaje de la subpoblación memoria central.

Las subpoblaciones de linfocitos T de memoria, especialmente los linfocitos T CD8+, desempeñan un papel crucial en la eficacia de la inmunoterapia, tanto en cáncer como en enfermedades autoinmunes. Estudios centrados en terapias contra el cáncer han demostrado que la presencia y expansión de esta subpoblación celular se asocia con mejores respuestas clínicas y pronósticos más favorables tras tratamientos con immune checkpoint inhibitors (ICIs) (232). *Liu et al* (233) se centraron en optimizar la terapia antitumoral mediante la selección y activación de linfocitos T de memoria, con el objetivo de lograr una respuesta eficaz y sostenida contra el tumor.

En las enfermedades autoinmunes, por el contrario, las células de memoria contribuyen a perpetuar y exacerbar la enfermedad, generando daño tisular crónico (234). En este contexto, la terapia se dirige hacia la modulación o eliminación de estas células para controlar la enfermedad (235).

En nuestra cohorte, el tratamiento con omalizumab se asoció con un incremento de los linfocitos T de memoria, de manera análoga a lo observado en inmunoterapias tumorales, sugiriendo que podrían contribuir a una mayor eficacia clínica y respuesta al tratamiento. Sin embargo, esta analogía debe considerarse de manera preliminar, ya que se requiere evidencia directa en UCE para confirmar el efecto específico de omalizumab sobre estas células.

Por otro lado, al centrarnos en los linfocitos T colaboradores, se observó un aumento tanto del perfil Th1 como del Th2 en nuestros pacientes tratados con omalizumab. Al igual que lo descrito en urticaria crónica, la regulación de los receptores FcεRI en células dendríticas podría desempeñar un papel importante en la modulación de ambas respuestas. Asimismo, se observaron porcentajes disminuidos de Th17 en las tres cohortes de asma, sin que fuera posible asociarlo al tratamiento con anti-IgE.

La monitorización de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ Th1 y Th2 podría aportar información relevante, ya que permitiría evidenciar la restauración de los porcentajes y analizar el efecto del omalizumab a largo plazo y su relación con la respuesta terapéutica, facilitando la individualización tanto de la dosis como del seguimiento clínico. Además, proporcionaría una valoración de la respuesta al tratamiento, pudiendo anticipar la evolución clínica y ajustar la dosis de manera personalizada.

Finalmente, el omalizumab logró normalizar la expresión de HLA-DR y CD38+, indicadores de activación, en los linfocitos CD4+, mientras que en los CD8+ su efecto fue más limitado, manteniéndose los porcentajes similares a los observados en la cohorte de asma leve.

Impacto del tratamiento con anti-IgE en urticaria crónica espontánea y asma grave alérgica

La evaluación del impacto del tratamiento con anti-IgE (omalizumab) sobre la modulación de las subpoblaciones de linfocitos T constituyó uno de nuestros objetivos de estudio. Como se mencionó anteriormente, el omalizumab forma complejos con la IgE, previniendo su unión a los receptores y evitando el entrecruzamiento de IgE, lo que bloquea eficazmente la desgranulación de mastocitos y la liberación de sus mediadores (236). Además, cuando los niveles de IgE se mantienen bajos gracias al tratamiento continuo, se reduce la expresión de los receptores FcεRI, contribuyendo a la mejoría clínica. No obstante, en la literatura actual, el efecto del omalizumab más allá de la inhibición de la IgE aún no está completamente esclarecido.

Nuestros resultados indican que el omalizumab promueve un perfil predominante de linfocitos T de memoria, el cual podría constituir un biomarcador potencial para predecir la respuesta terapéutica y la mejoría clínica de los pacientes. Además, el tratamiento con anti-IgE contribuye a restaurar el equilibrio entre las subpoblaciones Th1 y Th2, corrigiendo los desajustes inmunológicos característicos de ambas patologías.

La reducción en la expresión de los receptores de alta afinidad en células dendríticas conlleva a una disminución de su actividad como células presentadoras de antígenos a los linfocitos T naïve. Este efecto ocasiona una disminución de la diferenciación hacia el perfil Th2 que a su vez puede contribuir a reducir la producción y liberación de citoquinas Th2 como IL-4, IL-5 e IL-13 (237). En ambas patologías, existe un perfil combinado Th1 y Th2 característico de la enfermedad. En pacientes con urticaria crónica, se ha asociado este perfil con un mecanismo complejo que involucra la interacción entre distintas vías inmunitarias, donde la respuesta Th1 y Th2 contribuyen conjuntamente a la inflamación y desarrollo de la UCE (238).

En el asma, se había hipotetizado un papel protector de las células Th1; sin embargo, estudios recientes demuestran su implicación en la inflamación y en el empeoramiento de la enfermedad (239). Las células Th1, mediante la liberación de IFN-γ, contribuyen a la inflamación crónica, a la resistencia a corticoides y a la gravedad de la enfermedad asmática (239).

En nuestro estudio, el omalizumab ejerce un efecto potenciador sobre la respuesta Th1 en ambas patologías. En UCE, este efecto permitió normalizar los porcentajes de Th1, mientras que, en asma, los porcentajes se mantuvieron elevados. En este último caso, la persistencia de la elevación de esta subpoblación Th1 podría estar relacionada con la propia fisiopatología del asma o con infecciones crónicas por patógenos, que inducen una estimulación sostenida de estas células (239).

Bajo este contexto, el impacto del omalizumab podría requerir un mayor tiempo de tratamiento para manifestarse, lo que explicaría la ausencia de diferencias con el grupo control en UCE.

Con respecto a las células Th2, hemos observado que el omalizumab mantiene o induce un aumento de la respuesta Th2. La acción del omalizumab sobre esta subpoblación podría explicarse por su capacidad para interrumpir la estimulación antigénica crónica mediada por IgE en órganos linfoides secundarios, donde residen predominantemente las células Th2 memoria central. Al reducir los niveles de IgE libre en suero y disminuir la expresión de los receptores FcεRI en las células presentadoras de antígenos, el omalizumab limitaría la presentación continua del alérgeno a las Th2 memoria central, favoreciendo la restauración de sus porcentajes y reduciendo la diferenciación hacia células Th2 memoria efectora. Posteriormente, debido a la menor reposición de las Th2 memoria central, se reducirían las Th2 memoria efectora residentes en tejidos, con la consiguiente disminución de las citocinas implicadas en la patología alérgica (IL-4, IL-5 e IL-13).

Por tanto, el mecanismo principal del omalizumab se centra en su efecto sobre los receptores de alta afinidad para la IgE, cuya modulación en las células presentadoras de antígeno favorece la restauración y el equilibrio de la respuesta inmunitaria.

En conjunto, nuestros hallazgos confirman lo descrito previamente en la literatura respecto a los efectos del omalizumab sobre la mejoría clínica en ambas patologías. Asimismo, se confirmó la utilidad de determinados parámetros séricos, como el DD, empleados en la práctica asistencial como biomarcadores de seguimiento y respuesta al tratamiento.

Cabe destacar que el aspecto más novedoso de este estudio radica en el análisis del efecto del omalizumab sobre el sistema inmunitario más allá del mecanismo IgE-dependiente. En este contexto, evidenciamos su influencia en las subpoblaciones de linfocitos T colaboradores, logrando la restauración de los porcentajes hasta niveles comparables con los del grupo control. Igualmente, se observó un favorecimiento hacia un perfil de linfocitos T de memoria, lo que podría aportar información sobre la respuesta al tratamiento y el reequilibrio de las subpoblaciones Th1 y Th2, sugiriendo una normalización de la respuesta inmunitaria adaptativa.

La monitorización de estas subpoblaciones, junto con la evaluación de la sintomatología del paciente, podría contribuir al desarrollo de futuras estrategias para la optimización del tratamiento en estos pacientes.

A pesar de los avances logrados en este trabajo, algunas limitaciones del estudio podrían influir en el análisis e interpretación de resultados. Entre ellas, destacan el tamaño limitado de la muestra y la ausencia de seguimiento longitudinal prolongado, factores que limitan la capacidad de evaluar los biomarcadores a largo plazo. Asimismo, la variabilidad tanto en las características de la muestra como de los pacientes dentro de una misma cohorte (diferencias en edad y en tiempos de respuesta) hacen que los hallazgos encontrados sean difíciles de interpretar en un contexto global.

Con el objetivo de caracterizar inmunológicamente ambas patologías, sería de utilidad realizar otros ensayos adicionales como la cuantificación de citocinas en distintos tiempos de respuesta al tratamiento y correlacionarlo con las poblaciones celulares correspondientes. También resultaría de especial interés analizar otras células implicadas en ambas patologías, como los linfocitos T reguladores y Th foliculares, para profundizar en el mecanismo de acción del anti-IgE. Finalmente, un siguiente paso relevante consistiría en el desarrollo de estudios prospectivos, con mayor tamaño muestral y diseño multicéntrico, que permitan validar de manera robusta estas subpoblaciones celulares como potenciales biomarcadores de seguimiento y respuesta terapéutica.

8. CONCLUSIONES

En concordancia con los objetivos planteados y resultados obtenidos, se destacan las siguientes conclusiones:

1. En pacientes con urticaria crónica espontánea y asma grave alérgica en tratamiento con anti-IgE se identificaron perfiles diferenciados de subpoblaciones linfocitarias T
2. Se confirmó la utilidad de la medición de la IgE total en pacientes tratados con omalizumab. Sin embargo, no se identificó ningún otro marcador sérico confiable que permitiera monitorizar de manera consistente la efectividad del tratamiento en pacientes con asma o UCE.
3. El tratamiento con anti-IgE modula la respuesta adaptativa, favoreciendo un perfil predominante de linfocitos T de memoria y la restauración de las respuestas Th1 y Th2, lo que indica que su mecanismo de acción va más allá de la inhibición de la IgE.
4. En pacientes tratados con omalizumab, tanto en urticaria crónica como en asma grave, la normalización de los porcentajes de subpoblaciones T de memoria, Th1 y Th2 a niveles comparables con los de la población sana podría constituir un marcador de respuesta terapéutica.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas, A; Lichtman, A; Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 2014. 560 p.
2. Ueno H, Hawrylowicz CM, Banchereau J. Immunological intervention in human diseases. *J Transl Med.* 2007;5(mDC):1–7.
3. Dispenza MC. Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Proc.* 2019;40(6):470–3.
4. A.Owen J, Punt J, Stranford SA, P.Jones P. KUBY. Inmunología. 7th ed. McGraw-Hill Interamericana de España, editor. Spain; 2014. 692 p.
5. Werner J. P. Delayed drug hypersensitivity reactions. *Ann Intern Med.* 2003;139(8):683–93.
6. Jutel M, Agache I, Zemelka-Wiacek M, Akdis M, Chivato T, del Giacco S, et al. Nomenclature of allergic diseases and hypersensitivity reactions: Adapted to modern needs: An EAACI position paper. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2023;78(11):2851–74.
7. Larché M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(10):761–71.
8. Sutton BJ, Davies AM, Bax HJ, Karagiannis SN. IgE antibodies: From structure to function and clinical translation. *Antibodies.* 2019;8(1).
9. Plattner K, Bachmann MF, Vogel M. On the complexity of IgE: The role of structural flexibility and glycosylation for binding its receptors. *Frontiers in Allergy.* 2023;4(March):21–5.
10. Bajwa SF, Mohammed RH. Type II Hypersensitivity Reaction. In: *StatPearls.* 2023.
11. Grattan C. Autoimmune chronic spontaneous urticaria. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2018;141(3):1165–6.
12. Uzzaman A, Cho SH. Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Proc.* 2012;33(SUPPL. 1):96–9.
13. Kolkhir P, Giménez-Arnau AM, Kulthanan K, Peter J, Metz M, Maurer M. Urticaria. *Nat Rev Dis Primers.* 2022;8(1).
14. Zuberbier T, Abdul Latiff AH, Abuzakouk M, Aquilina S, Asero R, Baker D, et al. The international EAACI/GA²LEN/EuroGuiDerm/APAAACI guideline for the definition, classification, diagnosis, and management of urticaria. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2022;77(3):734–66.
15. Bonnekoh H, Krause K, Kolkhir P. Chronic recurrent wheals – If not chronic spontaneous urticaria, what else? *Allergologie.* 2023;46(1):41–50.
16. Giménez-Arnau AM, Vilar Alejo J, Moreno Ramirez D. Manejo diagnóstico y terapéutico de la urticaria crónica por el dermatólogo y papel del servicio de dermatología. *Actas Dermosifiliogr.* 2015;106(7):528–32.
17. Recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de la urticaria en pediatría Comité Nacional de Alergia. *Arch Argent Pediatr.* 2021;119(2):54–66.
18. Zuberbier T, Aberer W, Asero R, Bindslev-Jensen C, Brzoza Z, Canonica GW, et al. The EAACI/GA²LEN/EDF/WAO Guideline for the definition, classification, diagnosis, and management of urticaria: The 2013 revision and update. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2014;69(7):868–87.
19. Folci M, Heffler E, Canonica GW, Furlan R, Brunetta E. Cutting edge: Biomarkers for chronic spontaneous urticaria. *J Immunol Res.* 2018;2018.
20. Bracken SJ, Abraham S, MacLeod AS. Autoimmune theories of chronic spontaneous urticaria. *Front Immunol.* 2019;10:1–10.
21. Maurer M, Khan DA, Elieh Ali Komi D, Kaplan AP. Biologics for the Use in Chronic Spontaneous Urticaria: When and Which. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice.* 2021;9(3):1067–78.
22. Kolkhir P, Muñoz M, Asero R, Ferrer M, Kocatürk E, Metz M, et al. Autoimmune chronic spontaneous urticaria. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2022;149(6):1819–31.

23. Church MK, Kolkhir P, Metz M, Maurer M. The role and relevance of mast cells in urticaria. *Immunol Rev.* 2018;282(1):232–47.
24. Altrichter S, Frischbutter S, Fok JS, Kolkhir P, Jiao Q, Skov PS, et al. The role of eosinophils in chronic spontaneous urticaria. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2020;145(6):1510–6.
25. Elias J, Kaplan AP, Brook MDS. Studies of the cellular infiltrate of chronic idiopathic urticaria : Prominence of. :914–8.
26. Natbony SF, Phillips ME, Elias JM, Godfrey HP, Kaplan AP. Histologic studies of chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 1983;71(2):177–83.
27. Kaplan A, Lebwohl M, Giménez-Arnau AM, Hide M, Armstrong AW, Maurer M. Chronic spontaneous urticaria: Focus on pathophysiology to unlock treatment advances. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2023;78(2):389–401.
28. Schmetzer O, Lakin E, Topal FA, Preusse P, Freier D, Church MK, et al. IL-24 is a common and specific autoantigen of IgE in patients with chronic spontaneous urticaria. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2018;142(3):876–82.
29. Dobrican CT, Muntean I, Pinteau I, Petricău C, Deleanu DM, Filip G. Immunological signature of chronic spontaneous urticaria (Review). *Exp Ther Med.* 2022;23(6):1–7.
30. Rossi AB, Herlaar E, Braselmann S, Huynh S, Taylor V, Frances R, et al. Identification of the Syk kinase inhibitor R112 by a human mast cell screen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2006;118(3):749–55.
31. Gimborn K, Lessmann E, Kuppig S, Krystal G, Huber M. Supraoptimal IgE or Antigen Levels. *The Journal of Immunology.* 2005;(10).
32. Yanase Y, Takahagi S, Ozawa K, Hide M. The role of coagulation and complement factors for mast cell activation in the pathogenesis of chronic spontaneous urticaria. *Cells.* 2021;10(7).
33. Schoepke N, Asero R, Ellrich A, Ferrer M, Gimenez-Arnau A, E. H. Grattan C, et al. Biomarkers and clinical characteristics of autoimmune chronic spontaneous urticaria: Results of the PURIST Study. Vol. 74, *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2019. 2427–2436 p.
34. Kolkhir P, Altrichter S, Asero R, Daschner A, Ferrer M, Giménez-Arnau A, et al. Autoimmune diseases are linked to type IIb autoimmune chronic spontaneous urticaria. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2021;13(3):545–59.
35. Kishan Kumar YH, Bhaskar S, Shankar K. Comparative study of positive versus negative autologous serum skin test in chronic spontaneous urticaria and its treatment outcome. *N Am J Med Sci.* 2016;8(1):25–30.
36. Ferrer M. Immunological events in chronic spontaneous urticaria. *Clin Transl Allergy.* 2015;5(1):1–8.
37. Lin W, Zhou Q, Liu C, Ying M, Xu S. Increased plasma IL-17, IL-31, and IL-33 levels in chronic spontaneous urticaria. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–6.
38. Saluja R, Khan M, Church MK, Maurer M. The role of IL-33 and mast cells in allergy and inflammation. *Clin Transl Allergy.* 2015;5(1):1–8.
39. Hsu CL, Neilsen C V., Bryce PJ. IL-33 is produced by mast cells and regulates IgE-dependent inflammation. *PLoS One.* 2010;5(8).
40. Ikeda K, Nakajima H, Suzuki K, Kagami SI, Hirose K, Suto A, et al. Mast cells produce interleukin-25 upon FcεRI-mediated activation. *Blood.* 2003;101(9):3594–6.
41. Hongjia L, Caiqing Z, Degan L, Fen L, Chao W, Jinxiang W, et al. IL-25 promotes Th2 immunity responses in airway inflammation of asthmatic mice via activation of dendritic cells. *Inflammation.* 2014;37(4):1070–7.
42. Ferrer M, Luquin E, Sanchez-Ibarrola A, Moreno C, Sanz ML, Kaplan AP. Secretion of cytokines, histamine and leukotrienes in chronic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;129(3):254–60.

43. Huilan Z, Runxiang L, Bihua L, Qing G. Role of the subgroups of T, B, natural killer lymphocyte and serum levels of interleukin-15, interleukin-21 and immunoglobulin e in the pathogenesis of urticaria. *Journal of Dermatology*. 2010;37(5):441–7.
44. Toubi E, Adir-Shani A, Kessel A, Shmuel Z, Sabo E, Hacham H. Immune aberrations in B and T lymphocytes derived from chronic urticaria patients. *J Clin Immunol*. 2000;20(5):371–8.
45. Chen Q, Zhong H, Chen WC, Zhai Z, Zhou Z, Song Z, et al. Different expression patterns of plasma Th1-, Th2-, Th17- and Th22-related cytokines correlate with serum autoreactivity and allergen sensitivity in chronic spontaneous urticaria. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2018;32(3).
46. Gonalo M, Gimenez-Arnau A, Al-Ahmad M, Ben-Shoshan M, Bernstein JA, Ensina LF, et al. The global burden of chronic urticaria for the patient and society*. *British Journal of Dermatology*. 2021;184(2):226–36.
47. Hollis K, Proctor C, McBride D, Balp MM, McLeod L, Hunter S, et al. Comparison of Urticaria Activity Score Over 7 Days (UAS7) Values Obtained from Once-Daily and Twice-Daily Versions: Results from the ASSURE-CSU Study. *Am J Clin Dermatol*. 2018;19(2):267–74.
48. Weller K, Groffik A, Church MK, Hawro T, Krause K, Metz M, et al. Development and validation of the Urticaria Control Test: A patient-reported outcome instrument for assessing urticaria control. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2014;133(5):1365-1372.e6.
49. Wang EA, Chan SK. Chronic Urticaria in Children: an Update on Diagnosis and Treatment. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2020;20(8):1–7.
50. Alizadeh Aghdam M, van den Elzen M, van Os-Medendorp H, van Dijk MR, Knol EF, Knulst AC, et al. Systemic and local evidence for complement involvement in chronic spontaneous urticaria. *Clin Transl Allergy*. 2021;11(5):1–8.
51. Baumann K, Marcelino J, Skov PS, Santos MCP, Wyroslak I, Scheffel J, et al. Autologous serum skin test reactions in chronic spontaneous urticaria differ from heterologous cell reactions. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2021;35(6):1338–45.
52. McGowan EC, Saini S. Update on the performance and application of basophil activation tests. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013;13(1):101–9.
53. Greaves MW, Tan KT. Chronic urticaria: Recent advances. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2007;33(1–2):134–43.
54. Netchiporouk E, Moreau L, Rahme E, Maurer M, Lejtenyi D, Ben-Shoshan M. Positive CD63 basophil activation tests are common in children with chronic spontaneous urticaria and linked to high disease activity. *Int Arch Allergy Immunol*. 2016;171(2):81–8.
55. Knol EF, Mul FPJ, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;88(3 PART 1):328–38.
56. Dvorak AM, MacGlashan DW, Morgan ES, Lichtenstein LM. Vesicular transport of histamine in stimulated human basophils. *Blood*. 1996;88(11):4090–101.
57. Kim Z, Choi BS, Kim JK, Won D II. Basophil markers for identification and activation in the indirect basophil activation test by flow cytometry for diagnosis of autoimmune urticaria. *Ann Lab Med*. 2016;36(1):28–35.
58. Zuberbier T, Schwarz S, Hartmann K, Pfrommer C, Czarnetzki BM. Histamine releasability of basophils and skin mast cells in chronic urticaria. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1996;51(1):24–8.
59. Marone G, Spadaro G, Patella V, Genovese A. The clinical relevance of basophil releasability. *J Allergy Clin Immunol*. 1994;94(6 PART 2):1293–303.
60. Moñino-Romero S, Hackler Y, Okas TL, Grekowitz EM, Fluhr JW, Hultsch V, et al. Positive Basophil Tests Are Linked to High Disease Activity and Other Features of Autoimmune

- Chronic Spontaneous Urticaria: A Systematic Review. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2023;11(8):2411–6.
61. Pesqué D, Andrades E, Torres-Bosó P, Soto D, Gimeno R, M Pujol R, et al. Relevance of the basophil activation test in a cohort of 240 patients with chronic spontaneous urticaria. *Clin Exp Dermatol.* 2024;50(3):551–7.
 62. Asero R, Cugno M. Biomarkers of chronic spontaneous urticaria and their clinical implications. *Expert Rev Clin Immunol.* 2021;17(3):247–54.
 63. Hiragun M, Hiragun T, Mihara S, Akita T, Tanaka J, Hide M. Prognosis of chronic spontaneous urticaria in 117 patients not controlled by a standard dose of antihistamine. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2013;68(2):229–35.
 64. Młynek A, Magerl M, Hanna M, Lhachimi S, Baiardini I, Canonica GW, et al. The German version of the chronic urticaria quality-of-life questionnaire: Factor analysis, validation, and initial clinical findings. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2009;64(6):927–36.
 65. Gregoriou S, Rigopoulos D, Katsambas A, Katsarou A, Papaioannou D, Gkouvi A, et al. Etiologic aspects and prognostic factors of patients with chronic urticaria: Nonrandomized, prospective, descriptive study. *J Cutan Med Surg.* 2009;13(4):198–203.
 66. Toubi E, Kessel A, Avshovich N, Bamberger E, Sabo E, Nusem D, et al. Clinical and laboratory parameters in predicting chronic urticaria duration: A prospective study of 139 patients. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2004;59(8):869–73.
 67. Sánchez J, Sánchez A, Cardona R. Clinical Characterization of Patients with Chronic Spontaneous Urticaria according to Anti-TPO IgE Levels. *J Immunol Res.* 2019;2019.
 68. Sánchez-Borges M, Tassinari S, Flores A. Características epidemiológicas en pacientes con urticaria crónica espontánea resistente al tratamiento con antihistamínicos. *Rev Alerg Mex.* 2015;62(4):279–86.
 69. Alyasin S, Hamidi M, Karimi AA, Amiri A, Ghaffarpasand F, Ehsaei MJ. Correlation between clinical findings and results of autologous serum skin test in patients with chronic idiopathic urticaria. *South Med J.* 2011;104(2):111–5.
 70. Caproni M, Volpi W, Giomi B, Cardinali C, Antiga E, Melani L, et al. Chronic idiopathic and chronic autoimmune urticaria: Clinical and immunopathological features of 68 subjects. *Acta Derm Venereol.* 2004;84(4):288–90.
 71. Tedeschi A, Lorini M, Suli C, Asero R. Serum interleukin-18 in patients with chronic ordinary urticaria: Association with disease activity. *Clin Exp Dermatol.* 2007;32(5):568–70.
 72. Kurt E, Aktas A, Aksu K, Keren M, Dokumacioglu A, Goss CH, et al. Autologous serum skin test response in chronic spontaneous urticaria and respiratory diseases and its relationship with serum interleukin-18 level. *Arch Dermatol Res.* 2011;303(9):643–9.
 73. Altrichter S, Frischbutter S, Fok JS, Kolkhir P, Jiao Q, Skov PS, et al. The role of eosinophils in chronic spontaneous urticaria. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2020;145(6):1510–6.
 74. Tedeschi A, Asero R, Lorini M, Marzano A V., Cugno M. Serum eotaxin levels in patients with chronic spontaneous urticaria. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2012;44(5):188–92.
 75. Woo YR, Jung KE, Koo DW, Lee JS. Vitamin D as a marker for disease severity in Chronic urticaria and its possible role in pathogenesis. *Ann Dermatol.* 2015;27(4):423–30.
 76. Grzanka A, Machura E, Mazur B, Misiolek M, Jochem J, Kasperski J, et al. Relationship between vitamin D status and the inflammatory state in patients with chronic spontaneous urticaria. *Journal of Inflammation (United Kingdom).* 2014;11(1):1–5.
 77. Antiga E, Volpi W, Fabbri P, Caproni M. Re: Serum thyroid autoantibodies in patients with idiopathic either acute or chronic urticaria. *J Endocrinol Invest.* 2010;33(5):357.

78. Curto-Barredo L, Yelamos J, Gimeno R, Mojal S, Pujol RM, Giménez-Arnau A. Basophil activation test identifies the patients with chronic spontaneous urticaria suffering the most active disease. *Immun Inflamm Dis*. 2016;4(4):441–5.
79. Pedersen NH, Sørensen JA, Ghazanfar MN, Zhang DG, Vestergaard C, Thomsen SF. Biomarkers for Monitoring Treatment Response of Omalizumab in Patients with Chronic Urticaria. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol 24, Page 11328. 2023;24(14):11328.
80. Chandrashekar L, Rajappa M, Sundar I, Munisamy M, Ananthanarayanan PH, Thappa DM, et al. Platelet activation in chronic urticaria and its correlation with disease severity. *Platelets*. 2014;25(3):162–5.
81. Magen E, Mishal J, Zeldin Y, Feldman V, Kidon M, Schlesinger M, et al. Increased mean platelet volume and C-reactive protein levels in patients with chronic urticaria with a positive autologous serum skin test. *American Journal of the Medical Sciences*. 2010;339(6):504–8.
82. Grattan CEH, Dawn G, Gibbs S, Francis DM. Blood basophil numbers in chronic ordinary urticaria and healthy controls: Diurnal variation, influence of loratadine and prednisolone and relationship to disease activity. *Clinical and Experimental Allergy*. 2003;33(3):337–41.
83. Tedeschi A, Asero R, Marzano A V., Lorini M, Fanoni D, Berti E, et al. Plasma levels and skin-eosinophil-expression of vascular endothelial growth factor in patients with chronic urticaria. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009;64(11):1616–22.
84. Kasperska-Zajac A, Sztylec J, Machura E, Jop G. Plasma IL-6 concentration correlates with clinical disease activity and serum C-reactive protein concentration in chronic urticaria patients. *Clinical and Experimental Allergy*. 2011;41(10):1386–91.
85. F. Paganin M.D., PhD., G. Mangiapan M.D. PhDAPMDAP, M.D. J. Attia M.D., S. Marchand-Adam M.D., PhD., F. Pellet M.D.,†, F. Milhe M.D. B, Melloni M.D., PhD., A. Bernady M.D., C. Raspaud M.D., C. Nocent M.D. PB, M.D. P, L. Guilleminault M.D. PhD. Lung function parameters in omalizumab responder patients: an interesting tool? *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017;
86. Kay A, Clark P, Maurer M, Ying S. Elevations in Th2-initiating cytokines (IL-33, IL-25, TSLP) in lesional skin from Chronic Spontaneous (“Idiopathic”) Urticaria. *British Journal of Dermatology* [Internet]. 2015;3174. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bjd.13621/abstract>
87. Ferrer M, Luquin E, Sanchez-Ibarrola A, Moreno C, Sanz ML, Kaplan AP. Secretion of cytokines, histamine and leukotrienes in chronic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;129(3):254–60.
88. Yang X, Chen L, Wang S, Wu Y, Zhou X, Meng Z. The correlation between Th17/Treg immune dysregulation and the disease severity in chronic spontaneous urticaria patients. *Immun Inflamm Dis*. 2023;11(7):1–11.
89. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2022 Update. Global Initiative for Asthma. 2022. p. 1–225.
90. Chung KF, Dixey P, Abubakar-Waziri H, Bhavsar P, Patel PH, Guo S, et al. Characteristics, phenotypes, mechanisms and management of severe asthma. *Chin Med J (Engl)*. 2022;135(10):1141–55.
91. Abbafati C, Abbas KM, Abbasi-Kangevari M, Abd-Allah F, Abdelalim A, Abdollahi M, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*. 2020;396(10258):1204–22.
92. Subbarao P, Mandhane PJ, Sears MR. Asthma: Epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ Canadian Medical Association Journal*. 2009;181(9).

93. World Health Organization. Asthma [Internet]. 2023. p. 1. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma>
94. Lötvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjermer L, Casale TB, Custovic A, et al. Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;127(2):355–60.
95. Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet*. 2006;368(9537):804–13.
96. Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *The Lancet*. 2008;372(9643):1107–19.
97. Kuruvilla ME, Lee FEH, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2019;56(2):219–33.
98. Initiative G. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*. 2020;36(6):685–704.
99. Miranda C, Busacker A, Balzar S, Trudeau J, Wenzel SE. Distinguishing severe asthma phenotypes: Role of age at onset and eosinophilic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004;113(1):101–8.
100. Barnes PJ, Adcock IM, Ito K. Histone acetylation and deacetylation: Importance in inflammatory lung diseases. *European Respiratory Journal*. 2005;25(3):552–63.
101. Lane SJ, Adcock IM, Richards D, Hawrylowicz C, Barnes PJ, Tak HL. Corticosteroid-resistant bronchial asthma is associated with increased c-fos expression in monocytes and T lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;102(12):2156–64.
102. Nelson RK, Bush A, Stokes J, Nair P, Akuthota P. Eosinophilic Asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2020;8(2):465–73.
103. Yamasaki A, Okazaki R, Harada T. Neutrophils and Asthma. *Diagnostics*. 2022;12(5).
104. Papaioannou AI, Fouka E, Ntontsi P, Stratakis G, Papiris S. Paucigranulocytic Asthma: Potential Pathogenetic Mechanisms, Clinical Features and Therapeutic Management. *J Pers Med*. 2022;12(5).
105. Hammad H, Lambrecht BN. The basic immunology of asthma. *Cell*. 2021;184(6):1469–85.
106. Pelaia C, Crimi C, Vatrella A, Tinello C, Terracciano R, Pelaia G. Molecular Targets for Biological Therapies of Severe Asthma. *Front Immunol*. 2020;11(November):1–11.
107. Schoettler N, Strek ME. Recent Advances in Severe Asthma: From Phenotypes to Personalized Medicine. *Chest*. 2020;157(3):516–28.
108. Nyenhuis SM, Schwantes EA, Evans MD, Mathur SK. Airway neutrophil inflammatory phenotype in older subjects with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(5):1163–5.
109. Gibson PG, McDonald VM, Marks GB. Asthma in older adults. *The Lancet*. 2010;376(9743):803–13.
110. Alvarez Gutiérrez FJ, López-Viña A. Guía Española para el Manejo del Asma. 2014. 50 p.
111. Alonso AT, López Viña A. Gravedad y Control. (Tabla 3):67–76.
112. Ferrer M, Alonso J. DESCRIPCION DEL INSTRUMENTO Cuestionario sobre el Control del Asma (ACQ). 2009;3–6.
113. Habib N, Pasha MA, Tang DD. Current Understanding of Asthma Pathogenesis and Biomarkers. *Cells*. 2022;11(17):1–17.
114. Parulekar AD, Diamant Z, Hanania NA. Role of T2 inflammation biomarkers in severe asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2016;22(1):59–68.
115. Tiotiu A. Biomarkers in asthma: state of the art. *Asthma Res Pract*. 2018;4(1):1–10.
116. Popović-Grle S, Štajduhar A, Lampalo M, Rnjak D. Biomarkers in different asthma phenotypes. *Genes (Basel)*. 2021;12(6).
117. Zuberbier T, Abdul Latiff AH, Abuzakouk M, Aquilina S, Asero R, Baker D, et al. The international EAACI/GA²LEN/EuroGuiDerm/APAAACI guideline for the definition,

- classification, diagnosis, and management of urticaria. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2021;1–33.
118. Kaplan AP. Treatment of chronic spontaneous urticaria. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2012;4(6):326–31.
 119. Rafi A, Castle SC, Uyemura K, Makinodan T. Immune dysfunction in the elderly and its reversal by antihistamines. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2003;57(5–6):246–50.
 120. Jauregui Presa I. Antihistaminicos H1: Revision. *Alergología e Inmunología Clínica*. 1999;14(5):300–12.
 121. Kulthanan K, Tuchinda P, Chularojanamontri L, Chanyachailert P, Korkij W, Chunharas A, et al. Clinical practice guideline for diagnosis and management of urticaria. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2016;34(3):190–200.
 122. Bachert C. The role of histamine in allergic disease: Re-appraisal of its inflammatory potential. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2002;57(4):287–96.
 123. Bocşan CI, Bujor AI, Miron N, Vesa ŞC, Deleanu D, Buzoianu AD. In vivo anti-inflammatory effect of H1 antihistamines in allergic rhinitis: A randomized clinical trial. *Balkan Med J*. 2015;32(4):352–8.
 124. Tsicopoulos A, De Nadai P. Antihistamines as anti-inflammatory agents. *Clinical and Experimental Allergy*. 2003;33(11):1476–8.
 125. Russell G, Graveley R, Seid J, Al-Humidan AK, Skjodt H. Mechanisms of action of cyclosporine and effects on connective tissues. *Semin Arthritis Rheum*. 1992;21(6 SUPPL. 3):16–22.
 126. Yosipovitch G, Biazus Soares G, Mahmoud O. Current and Emerging Therapies for Chronic Spontaneous Urticaria: A Narrative Review. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2023;13(8):1647–60.
 127. Kulthanan K, Chaweekulrat P, Komoltri C, Hunnangkul S, Tuchinda P, Chularojanamontri L, et al. Cyclosporine for Chronic Spontaneous Urticaria: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2018;6(2):586–99.
 128. Endo T, Toyoshima S, Kanegae K, Izaki S, Nishimori N, Ito M, et al. Identification of biomarkers for predicting the response to cyclosporine A therapy in patients with chronic spontaneous urticaria. *Allergology International*. 2019;68(2):270–3.
 129. Tal Y, Toker O, Agmon-Levin N, Shalit M. Azathioprine as a therapeutic alternative for refractory chronic urticaria. *Int J Dermatol*. 2015;54(3):367–9.
 130. Zimmerman AB, Berger EM, Elmariah SB, Soter NA. The use of mycophenolate mofetil for the treatment of autoimmune and chronic idiopathic urticaria: Experience in 19 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2012;66(5):767–70.
 131. Plaza V, Alobid I, Alvarez C, Blanco M, Ferreira J, García G, et al. Guía española para el manejo del asma (GEMA) versión 5.1. Aspectos destacados y controversias. *Arch Bronconeumol*. 2022;58(2):150–8.
 132. Liang Y, Wang D, Hua D, Liao H, Chen R. Short-term oral corticosteroids for initial treatment of moderate-to-severe persistent asthma: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Respir Med*. 2020;172(August):106126.
 133. Tan DJ, Bui DS, Dai X, Lodge CJ, Lowe AJ, Thomas PS, et al. Does the use of inhaled corticosteroids in asthma benefit lung function in the long-term? A systematic review and meta-analysis. *European Respiratory Review*. 2021;30(159):1–14.
 134. Hansel TT. How do we measure the effectiveness of inhaled corticosteroids in clinical studies? *Respir Med*. 2004;98(SUPPL. 2).
 135. Georas SN. Inhaled glucocorticoids, lymphocytes, and dendritic cells in asthma and obstructive lung diseases. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(3):215–21.
 136. El-Radhi AS, Hogg CL, Bungre JK, Bush A, Corrigan CJ. Effect of oral glucocorticoid treatment on serum inflammatory markers in acute asthma. *Arch Dis Child*. 2000;83(2):158–62.

137. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Rückert B, et al. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004;114(6):1425–33.
138. Chambers ES, Nanzer AM, Pfeffer PE, Richards DF, Martineau AR, Griffiths CJ, et al. Dendritic cell phenotype in severe asthma reflects clinical responsiveness to glucocorticoids. *Clinical and Experimental Allergy*. 2018;48(1):13–22.
139. Wang M, Gao P, Wu X, Chen Y, Feng Y, Yang Q, et al. Impaired anti-inflammatory action of glucocorticoid in neutrophil from patients with steroid-resistant asthma. *Respir Res*. 2016;17(1):1–9.
140. Chaudhury A, Gaude GS, Hattiholi J. Effects of oral montelukast on airway function in acute asthma: A randomized trial. *Lung India*. 2017;34(4):349–54.
141. Ramsay CF, Sullivan P, Gizycki M, Wang D, Swern AS, Barnes NC, et al. Montelukast and bronchial inflammation in asthma: A randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Respir Med*. 2009;103(7):995–1003.
142. Ilarraz R, Wu Y, Adamko DJ. Montelukast inhibits leukotriene stimulation of human dendritic cells in vitro. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;159(4):422–7.
143. Wu AY, Chik SC, Chan AW, Li Z, Tsang KW, Li W. Anti-inflammatory effects of high-dose montelukast in an animal model of acute asthma. *Clinical and Experimental Allergy*. 2003;33(3):359–66.
144. Qu X, Chen Y, Yin C. Effect of montelukast on the expression of CD4+CD25+ regulatory T cells in children with acute bronchial asthma. *Exp Ther Med*. 2018;16(3):2381–6.
145. Newton R, Gienbycz MA. Understanding how long-acting β 2-adrenoceptor agonists enhance the clinical efficacy of inhaled corticosteroids in asthma – an update. *Br J Pharmacol*. 2016;173(24):3405–30.
146. Scola AM, Loxham M, Charlton SJ, Peachell PT. The long-acting β -adrenoceptor agonist, indacaterol, inhibits IgE-dependent responses of human lung mast cells. *Br J Pharmacol*. 2009;158(1):267–76.
147. Agache I, Adcock IM, Akdis CA, Akdis M, Bentabol-Ramos G, van den Berge M, et al. The Bronchodilator and Anti-Inflammatory Effect of Long-Acting Muscarinic Antagonists in Asthma: An EAACI Position Paper. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2025;80(2):380–94.
148. Logsdon SL, Oettgen HC. Anti-ige therapy: Clinical utility and mechanistic insights. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;388:39–61.
149. Poddighe D, Vangelista L. Effects of omalizumab on basophils: Potential biomarkers in asthma and chronic spontaneous urticaria. *Cell Immunol*. 2020;358:104215.
150. Hanf G, Brachmann I, Kleine-Tebbe J, Seybold J, Kunkel G, Suttorp N, et al. Omalizumab decreased IgE-release and induced changes in cellular immunity in patients with allergic asthma. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;61(9):1141–4.
151. Noga O, Hanf G, Brachmann I, Klucken AC, Kleine-Tebbe J, Rosseau S, et al. Effect of omalizumab treatment on peripheral eosinophil and T-lymphocyte function in patients with allergic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;117(6):1493–9.
152. Altrichter S, Fok JS, Jiao Q, Kolkhir P, Pyatilova P, Romero SM, et al. Total ige as a marker for chronic spontaneous urticaria. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2021;13(2):206–18.
153. Kaplan A, Ferrer M, Bernstein JA, Antonova E, Trzaskoma B, Raimundo K, et al. Timing and duration of omalizumab response in patients with chronic idiopathic/spontaneous urticaria. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016;137(2):474–81.
154. Holguin F, Cardet JC, Chung KF, Diver S, Ferreira DS, Fitzpatrick A, et al. Management of severe asthma: A European Respiratory Society/American Thoracic Society guideline. *European Respiratory Journal*. 2020;55(1).
155. Abadeh A, Lee JK. Long-term follow-up of patients treated with dupilumab for chronic spontaneous urticaria: A case report. *SAGE Open Med Case Rep*. 2022;10:5–6.

156. Chen CY, Wu KH, Guo BC, Lin WY, Chang YJ, Wei CW, et al. Personalized Medicine in Severe Asthma: From Biomarkers to Biologics. *Int J Mol Sci.* 2024;25(1).
157. Combalia A, Losno RA, Prieto-González S, Mascaró JM. Rituximab in refractory chronic spontaneous urticaria: An encouraging therapeutic approach. *Skin Pharmacol Physiol.* 2018;31(4):184–7.
158. Kolkhir P, Altrichter S, Munoz M, Hawro T, Maurer M. New treatments for chronic urticaria. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology.* 2020;124(1):2–12.
159. Sabag DA, Matanes L, Bejar J, Sheffer H, Barzilai A, Church MK, et al. Interleukin-17 is a potential player and treatment target in severe chronic spontaneous urticaria. *Clinical and Experimental Allergy.* 2020;50(7):799–804.
160. Wilson LH, Eliason MJ, Leiferman KM, Hull CM, Powell DL. Treatment of refractory chronic urticaria with tumor necrosis factor- α inhibitors. *J Am Acad Dermatol.* 2011;64(6):1221–2.
161. O'Donnell BF, Barr RM, Kobza Black A, Francis DM, Kerman F, Niimi N, et al. Intravenous immunoglobulin in autoimmune chronic urticaria. *British Journal of Dermatology.* 1998;138(1):101–6.
162. Mitzel-Kaoukhov H, Staubach P, Müller-Brenne T. Effect of high-dose intravenous immunoglobulin treatment in therapy-resistant chronic spontaneous urticaria. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology.* 2010;104(3):253–8.
163. Arm JP, Bottoli I, Skerjanec A, Floch D, Groenewegen A, Maahs S, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of QGE031 (ligelizumab), a novel high-affinity anti-IgE antibody, in atopic subjects. *Clinical and Experimental Allergy.* 2014;44(11):1371–85.
164. Wedi B. Ligelizumab for the treatment of chronic spontaneous urticaria. *Expert Opin Biol Ther.* 2020;20(8):853–61.
165. Kuo BS, Li CH, Chen JB, Shiung YY, Chu CY, Lee CH, et al. IgE-neutralizing UB-221 mAb, distinct from omalizumab and ligelizumab, exhibits CD23-mediated IgE downregulation and relieves urticaria symptoms. *Journal of Clinical Investigation.* 2022;132(15):1–16.
166. Mendes-Bastos P, Brasileiro A, Kolkhir P, Frischbutter S, Scheffel J, Moñino-Romero S, et al. Bruton's tyrosine kinase inhibition—An emerging therapeutic strategy in immune-mediated dermatological conditions. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2022;77(8):2355–66.
167. Oras A, Quirant-Sanchez B, Popadic D, Thunberg S, Winqvist O, Heck S, et al. Comprehensive flow cytometric reference intervals of leukocyte subsets from six study centers across Europe. *Clin Exp Immunol.* 2020;202(3):363–78.
168. Spertino J, Curto Barredo L, Rozas Muñoz E, Figueras Nart I, Gimenez Arnau A, Serra Baldrich E, et al. Algorithm for Treatment of Chronic Spontaneous Urticaria with Omalizumab. *Actas Dermosifiliogr.* 2018;109(9):771–6.
169. Santos AF, Alpan O, Hoffmann HJ. Basophil activation test: Mechanisms and considerations for use in clinical trials and clinical practice. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2021;76(8):2420–32.
170. Curto-Barredo L, Yelamos J, Gimeno R, Mojal S, Pujol RM, Giménez-Arnau A. Basophil activation test identifies the patients with chronic spontaneous urticaria suffering the most active disease. *Immun Inflamm Dis.* 2016;4(4):441–5.
171. Marcelino J, Baumann K, Skov PS, Pereira Santos MC, Wyroslak I, Scheffel J, et al. What Basophil Testing Tells Us About CSU Patients – Results of the CORSA Study. *Front Immunol.* 2021;12(September):1–9.
172. López C, Depreux N, Bielsa I, Roger A, Quirant-Sanchez B, Basagaña M, et al. Peripheral blood T-cell modulation by omalizumab in chronic urticaria patients. *Front Immunol.* 2024;15(August):1–10.
173. Gaig P, Olona M, Muñoz Lejarazu D, Caballero MT, Domínguez FJ, Echechipia S, et al. Epidemiology of urticaria in Spain. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2004;14(3):214–20.

174. Ferrer Puga M, Silvestre Salvador JF, Bartra Tomas J, Giménez-Arnau A, Labrador-Horrillo M, Miquel-Miquel J, et al. Daily Clinical Practice in the Management of Chronic Urticaria in Spain: Results of the UCRES Study. *Actas Dermosifiliogr.* 2022;113(1):T4–14.
175. Kolkhir P, André F, Church MK, Maurer M, Metz M. Potential blood biomarkers in chronic spontaneous urticaria. *Clinical and Experimental Allergy.* 2017;47(1):19–36.
176. Asero R, Marzano A V., Ferrucci S, Cugno M. D-Dimer Plasma Levels Parallel the Clinical Response to Omalizumab in Patients with Severe Chronic Spontaneous Urticaria. *Int Arch Allergy Immunol.* 2017;172(1):40–4.
177. Tarkowski B, Ławniczak J, Tomaszewska K, Kurowski M, Zalewska-Janowska A. Chronic Urticaria Treatment with Omalizumab—Verification of NLR, PLR, SIRI and SII as Biomarkers and Predictors of Treatment Efficacy. *J Clin Med.* 2023;12(7).
178. Kasumagic-Halilovic E, Beslic N, Ovcina-Kurtovic N. Thyroid Autoimmunity in Patients with Chronic Urticaria. *Med Arch.* 2017;71(1):29–31.
179. Tienforti D, Di Giulio F, Spagnolo L, Castellini C, Totaro M, Muselli M, et al. Chronic urticaria and thyroid autoimmunity: a meta-analysis of case–control studies. *J Endocrinol Invest.* 2022;45(7):1317–26.
180. Aktaş ÖÖ, Çimşir DÖ, Bülbül EN, Şerbetçi N, Fendoğlu TZ, İnan E, et al. Biomarkers of response to omalizumab in patients with chronic spontaneous urticaria. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2025;53(4):7–13.
181. Asero R, Ferrucci SM, Calzari P, Consonni D, Cugno M. Thyroid Autoimmunity in CSU: A Potential Marker of Omalizumab Response? *Int J Mol Sci.* 2023;24(8).
182. Kolkhir P, Metz M, Altrichter S, Maurer M. Comorbidity of chronic spontaneous urticaria and autoimmune thyroid diseases: A systematic review. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2017;72(10):1440–60.
183. Gericke J, Metz M, Ohanyan T, Weller K, Altrichter S, Skov PS, et al. Serum autoreactivity predicts time to response to omalizumab therapy in chronic spontaneous urticaria. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2017;139(3):1059-1061.e1.
184. Vasagar K, Vonakis BM, Gober LM, Viksman A, Jr SPG, Saini SS. Evidence of in vivo basophil activation in chronic idiopathic urticaria *Clinical and Experimental Allergy. In Vitro.* 2006;770–6.
185. Serrano-Candelas E, Martínez-Aranguren R, Vega O, Gastaminza G, Bartra J, Audicana MT, et al. Omalizumab efficacy in cases of chronic spontaneous urticaria is not explained by the inhibition of sera activity in effector cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–12.
186. Gericke J, Ohanyan T, Church MK, Maurer M, Metz M. Omalizumab may not inhibit mast cell and basophil activation in vitro. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 2015;29(9):1832–6.
187. A RT, LM FP, S RC, JA GT, C CH. Monitoring omalizumab treatment efficacy in chronic urticaria by the basophil activation test. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2012;40(6):390–2.
188. Pakkasela J, Salmela P, Juntunen P, Karjalainen J, Lehtimäki L. Age at asthma diagnosis and onset of symptoms among adults with allergic and non-allergic asthma. *Eur Clin Respir J.* 2023;10(1).
189. Menzella F, Galeone C, Formisano D, Castagnetti C, Ruggiero P, Simonazzi A, et al. Real-life efficacy of omalizumab after 9 years of follow-up. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2017;9(4):368–72.
190. Junyi Liao, Jia Tang, Yuanping Jiang, Youwen Wang JD, He Y. Effects of omalizumab on lung function in patients with moderate-to-severe allergic asthma: a systematic review and meta-analysis. *Ther Adv Respir Dis.* 2024;8:1–11.
191. Jahan R, Huq Z. Real-world clinical utility (effectiveness) of omalizumab as add-on therapy in patient with difficult-to-treat severe allergic asthma. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery.* 2025;8(August 2024):100218.

192. Cabrejos S, Moreira A, Ramirez A, Quirce S, Campos GS, Dávila I, et al. Fenoma study: Achieving full control in patients with severe allergic asthma. *J Asthma Allergy*. 2020;13:159–66.
193. Shin JW, Sue JH, Song TW, Kim KW, Kim ES, Sohn MH, et al. Atopy and house dust mite sensitization as risk factors for asthma in children. *Yonsei Med J*. 2005;46(5):629–34.
194. Brzozowska A, Woicka-Kolejwa K, Jerzynska J, Majak P, Stelmach I. Allergic Rhinitis and House Dust Mite Sensitization Determine Persistence of Asthma in Children. *Indian J Pediatr*. 2022;89(7):673–81.
195. Massanari M, Holgate ST, Busse WW, Jimenez P, Kianifard F, Zeldin R. Effect of omalizumab on peripheral blood eosinophilia in allergic asthma. *Respir Med*. 2010;104(2):188–96.
196. Skiepkowski R, Zietkowski Z, Lukaszuk M, Budny W, Skiepkowski U, Milewski R, et al. Changes in blood eosinophilia during omalizumab therapy as a predictor of asthma exacerbation. *Postepy Dermatol Alergol*. 2014;31(5):305–9.
197. Hill DA, Siracusa MC, Ruymann KR, Tait Wojno ED, Artis D, Spergel JM. Omalizumab therapy is associated with reduced circulating basophil populations in asthmatic children. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2014;69(5):674–7.
198. Holgate S, Smith N, Massanari M, Jimenez P. Effects of omalizumab on markers of inflammation in patients with allergic asthma. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009;64(12):1728–36.
199. Lee HY, Jeon HS, Jang JH, Lee Y, Shin YS, Nahm DH, et al. Predicting responses to omalizumab in antihistamine-refractory chronic urticaria: A real-world longitudinal study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: Global*. 2024;3(2):100245.
200. Ensina LF, Brandão L, Arruda LK, Sarquis Serpa F, Campos RA, Valle SRO, et al. IgE as a predictor to omalizumab response in patients with chronic spontaneous urticaria. *Frontiers in Allergy*. 2024;5(January):1–4.
201. Li B, Huang M, Huang S, Zeng X, Yuan Y, Peng X, et al. Prediction of clinical response to omalizumab in moderate-to-severe asthma patients using the change in total serum IgE level. *J Thorac Dis*. 2020;12(12):7097–105.
202. Gon Y, Maruoka S, Mizumura K. Omalizumab and IgE in the Control of Severe Allergic Asthma. *Front Pharmacol*. 2022;13(March):1–8.
203. Eckl-Dorna J. Omalizumab's Impact on Total and Allergen-Specific IgE Levels: A Polyclonal Story. *Int Arch Allergy Immunol*. 2016;169(2):69–70.
204. Maggi L, Rossetti B, Montaini G, Matucci A, Vultaggio A, Mazzoni A, et al. Omalizumab dampens type 2 inflammation in a group of long-term treated asthma patients and detaches IgE from FcεRI. *Eur J Immunol*. 2018;48(12):2005–14.
205. Ito R, Gon Y, Nunomura S, Atsuta R, Harada N, Hattori T, et al. Development of assay for determining free IgE levels in serum from patients treated with omalizumab. *Allergology International*. 2014;63(SUPPL. 1):37–47.
206. Chang TW, Chen C, Lin CJ, Metz M, Church MK, Maurer M. The potential pharmacologic mechanisms of omalizumab in patients with chronic spontaneous urticaria. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;135(2):337–342.e2.
207. Toubi E, Vadasz Z. The emerging role of il-17 in the immune-pathogenesis of chronic spontaneous urticaria. *Immunotargets Ther*. 2020;9:217–23.
208. Giménez-Arnau AM, DeMontojoye L, Asero R, Cugno M, Kulthanan K, Yanase Y, et al. The Pathogenesis of Chronic Spontaneous Urticaria: The Role of Infiltrating Cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2021;9(6):2195–208.
209. Mekori YA, Giorno RC, Anderson P, Kohler PF. Lymphocyte subpopulations in the skin of patients with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 1983;72(6):681–4.
210. Casale TB, Bernstein JA, Maurer M, Saini SS, Trzaskoma B, Chen H, et al. Similar Efficacy with Omalizumab in Chronic Idiopathic/Spontaneous Urticaria Despite Different

- Background Therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2015;3(5):743-750.e1.
211. Maurer M, Rosén K, Hsieh HJ, Saini S, Grattan C, Giménez-Arnau A, et al. Omalizumab for the Treatment of Chronic Idiopathic or Spontaneous Urticaria. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(10):924–35.
 212. Moy AP, Murali M, Nazarian RM. Identification of a Th2- and Th17-skewed immune phenotype in chronic urticaria with Th22 reduction dependent on autoimmunity and thyroid disease markers. *J Cutan Pathol*. 2016;43(4):372–8.
 213. Holgate ST, Djukanović R, Casale T, Bousquet J. Anti-immunoglobulin E treatment with omalizumab in allergic diseases: An update on anti-inflammatory activity and clinical efficacy. *Clinical and Experimental Allergy*. 2005;35(4):408–16.
 214. Prosty C, Gabrielli S, Ben-Shoshan M, Le M, Giménez-Arnau AM, Litvinov I V., et al. In silico Identification of Immune Cell-Types and Pathways Involved in Chronic Spontaneous Urticaria. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9(July).
 215. Wang SF, Gao XQ, Xu YN, Li DN, Wang HY, He SH. Elevated plasma level of interferon-1 in chronic spontaneous urticaria: Upregulated expression in CD8+ and epithelial cells and induction of inflammatory cell accumulation. *Mediators Inflamm*. 2016;2016.
 216. Moldaver DM, Larché M, Rudulier CD. An Update on Lymphocyte Subtypes in Asthma and Airway Disease. *Chest*. 2017;151(5):1122–30.
 217. Krug N, Madden J, Redington AE, Lackie P, Djukanovic R, Schauer U, et al. T-Cell Cytokine Profile Evaluated at the Single Cell Level in BAL and Blood in Allergic Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;14(4):319–26.
 218. Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 1999;103(2):175–83.
 219. Wang Y, Liu L. Immunological factors, important players in the development of asthma. *BMC Immunol*. 2024;25(1):1–10.
 220. Gauthier M, Kale SL, Ray A. T1-T2 Interplay in the Complex Immune Landscape of Severe Asthma. *Immunol Rev*. 2025;330(1).
 221. Reza MI, Ambhore NS. Inflammation in Asthma: Mechanistic Insights and the Role of Biologics in Therapeutic Frontiers. *Biomedicines*. 2025;13(6):1–32.
 222. Boulet LP. Effects of steroid therapy on inflammatory cell subtypes in asthma. Vol. 65, *Thorax*. 2010. 374–376 p.
 223. Zuśka-Prot M, Maślanka T. Effect of inhaled and systemic glucocorticoid treatment on CD4+ regulatory and effector T cells in a mouse model of allergic asthma. *Int Immunopharmacol*. 2017;45:98–109.
 224. Miyahara N, Swanson BJ, Takeda K, Taube C, Miyahara S, Kodama T, et al. Effector CD8+ T cells mediate inflammation and airway hyper-responsiveness. *Nat Med*. 2004;10(8):865–9.
 225. Ramonell RP, Oriss TB, McCreary-Partyka JC, Kale SL, Brandon NR, Ross MA, et al. CD8+ TEMRAs in severe asthma associate with asthma symptom duration and escape proliferation arrest. *JCI Insight*. 2025;10(8).
 226. Hilvering B, Hinks TSC, Stöger L, Marchi E, Salimi M, Shrimanker R, et al. Synergistic activation of pro-inflammatory type-2 CD8+ T lymphocytes by lipid mediators in severe eosinophilic asthma. *Mucosal Immunol*. 2018;11(5):1408–19.
 227. Gelfand EW, Hinks TSC. Is there a role for type 2 CD8+ T cells in patients with steroid-resistant asthma? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2019;144(3):648–50.
 228. Grupe S. Allergy and clinical immunology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1998;101(6 II).
 229. Tamaoki J. Role of a Th2 cytokine inhibitor in asthma treatment. *Allergology International*. 2004;53(2):55–60.

230. Barnes PJ. Current issues for establishing inhaled corticosteroids as the antiinflammatory agents of choice in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1998;101(4 SUPPL.).
231. Bosnjak B, Stelzmueller B, Erb KJ, Epstein MM. Treatment of allergic asthma: Modulation of Th2 cells and their responses. *Respir Res*. 2011;12(1):114.
232. Jin Y, Tan A, Feng J, Xu Z, Wang P, Ruan P, et al. Prognostic Impact of Memory CD8(+) T Cells on Immunotherapy in Human Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2021;11(June):1–10.
233. Liu Q, Sun Z, Chen L. Memory T cells: strategies for optimizing tumor immunotherapy. *Protein Cell*. 2020;11(8):549–64.
234. Sheean et al. 2013, Jones R. Autoimmune effector memory T cells: the bad and the good. *Immunol Resp*. 2013;57(1):12–22.
235. Wu H, Liao W, Li Q, Long H, Yin H, Zhao M, et al. Pathogenic role of tissue-resident memory T cells in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2018;17(9):906–11.
236. Johansson SGO, Haahtela T, O'Byrne PM. Omalizumab and the immune system: An overview of preclinical and clinical data. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 2002;89(2):132–8.
237. Vennera C, Picado C. Patologías mediadas por la inmunoglobulina E: de la inmunoglobulina E al omalizumab. *Inmunologia*. 2012;1(4):119–26.
238. Ferrer M, Kaplan AP. Progress and challenges in the understanding of chronic urticaria. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*. 2007;3(1):31–5.
239. Luo W, Hu J, Xu W, Dong J. Distinct spatial and temporal roles for Th1, Th2, and Th17 cells in asthma. *Front Immunol*. 2022;13(August):1–15.

10. ANEXO I



OPEN ACCESS

EDITED BY

R. Maximiliano Gomez,
Catholic University of Salta, Argentina

REVIEWED BY

Francisca Palomares,
Universidad de Sevilla, Spain
Elias Toubi,
Technion Israel Institute of Technology, Israel

*CORRESPONDENCE

Eva Martinez-Caceres

✉ EvaMariaCabeza.Martinez@uab.cat

Aina Teniente-Serra

✉ Aina.Teniente@uab.cat

RECEIVED 08 April 2024

ACCEPTED 15 July 2024

PUBLISHED 20 August 2024

CITATION

López C, Depreux N, Bielsa I, Roger A,
Quirant-Sánchez B, Basagaña M, Jurgens Y,
Padró C, Miquel S, Martínez-Caceres E and
Teniente-Serra A (2024) Peripheral blood
T-cell modulation by omalizumab
in chronic urticaria patients.
Front. Immunol. 15:1413233.
doi: 10.3389/fimmu.2024.1413233

COPYRIGHT

© 2024 López, Depreux, Bielsa, Roger,
Quirant-Sánchez, Basagaña, Jurgens, Padró,
Miquel, Martínez-Caceres and Teniente-Serra.
This is an open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or reproduction
is permitted which does not comply with
these terms.

Peripheral blood T-cell modulation by omalizumab in chronic urticaria patients

Cristina López^{1,2}, Nathalie Depreux³, Isabel Bielsa⁴,
Albert Roger³, Bibiana Quirant-Sánchez^{1,2}, Maria Basagaña³,
Yanina Jurgens³, Clara Padró³, Sira Miquel³,
Eva Martínez-Caceres^{1,2*} and Aina Teniente-Serra^{1,2*}

¹Immunology Division, Laboratori Clínic Metropolitana Nord (LCMN), Germans Trias i Pujol University Hospital and Research Institute (IGTP), Badalona, Spain, ²Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain, ³Allergy Section, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain, ⁴Department of Dermatology, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain

Background: Chronic spontaneous urticaria (CSU) is a highly prevalent and difficult to manage cutaneous disease characterized by the presence of recurrent urticaria, angioedema, or both, for a period of 6 weeks or longer. One of the biological treatments used for patients with CSU with an autoimmune background and bad control of the disease is omalizumab, an anti-IgE monoclonal antibody. The understanding of the mechanism of action of this biological drug in CSU along with the identification of potential biomarkers of clinical response can be helpful in the personalized management of the disease.

Objective: The purpose of this study was to analyze the effect of omalizumab on peripheral blood lymphocyte subpopulations in patients with CSU in order to identify potential biomarkers of treatment response.

Methods: We analyzed 71 patients with CSU [33 under omalizumab and 38 under non-immunomodulatory drugs (treated with antihistamines; NID)] and 50 healthy controls. An exhaustive immunophenotyping of whole blood T-cell subpopulations, including naïve, central memory, effector memory, effector cells, Th1, Th2, and Th17 was performed by multiparametric flow cytometry. Moreover, in CSU patients, we analyzed markers of inflammation (ESR, DD, CRP), atopy (prick test, IgE quantification), and autoimmunity (anti-thyroid antibodies and indirect basophil activation test). To evaluate the clinical activity, the Urticaria Activity Score 7 (UAS 7) test was used.

Results: In patients with CSU under treatment with omalizumab, there was a significant decrease in the percentage of naïve and an increase in the percentage of central memory CD4 T cells as well as a decrease in the percentage of naïve and increase in the percentage of effector CD8 T-cell subsets. Moreover, patients under treatment with omalizumab had higher percentages of Th1 and Th2 cells than patients under treatment with NID.

Conclusion: The immune monitoring of T-cell subpopulations in patients with CSU starting omalizumab, may be a useful strategy to analyze treatment response in the clinical practice.

KEY WORDS

chronic urticaria, autoimmune chronic urticaria, immune profile, omalizumab, immune system

1 Introduction

Chronic spontaneous urticaria (CSU) is defined as the appearance of hive-like lesions that may be accompanied by angioedema and last for 6 or more weeks (1). The disorder is highly prevalent and has an important effect on the patients' quality of life (2, 3). Unfortunately, little is known about the pathophysiology of the disease. It has been postulated that various hypersensitivity mechanisms could be involved in its pathogenesis. There are various hypersensitive reactions regarding immunological urticaria including type I (mediated by IgE that will lead to acute urticaria symptoms), type II [involved IgG leading to chronic autoimmune urticaria (CAU)], and type IV (mediated by T lymphocytes, potentially involved in CSU). The most recognized mechanisms involved in this pathology are those mediated by IgG autoantibodies (3).

In recent years, a new phenotype has been described, known as CAU, whose mechanism is not fully established. It has been widely accepted the involvement of an autoimmune background supported by the presence of IgG autoantibodies anti-IgE and IgG anti-FcRI and IgE autoantibodies against in sera from patients with CAU (4, 5). These autoantibodies, present in 45%–55% of CAU patients, can activate the classical complement pathway through the formation of immune complexes with IgG and free IgE (4, 5). Additionally, as observed in other autoimmune diseases, the emergence of these IgG autoantibodies is correlated with the presence of additional autoantibodies, primarily antithyroid antibodies (anti-TPO and anti-thyroglobulin), which may trigger autoimmune thyroiditis (6, 7). All these elements underscore the pivotal role of the immune system in the pathophysiology of CSU.

Previous studies analyzing the immunophenotype of CSU patients showed an increase of B cells, controlled mainly by IL-21 and IL-15 cytokines (8). In relation to T lymphocytes, a mixed Th1 and Th2 profile was observed, characterized by the secretion of cytokines such as IL-6, TNF- α , and IFN- γ (8, 9). Furthermore, a reduction in the number of Th17 and regulatory T cells has also been described (9). Regarding activation markers, it has been demonstrated that, in CSU patients, T-cell activation correlates with mast cell degranulation (5, 10). Furthermore, skin biopsies from CAU patients revealed a predominant infiltration of CD4⁺ T cells primarily comprising activated CD4⁺ T cells (expressing HLA-DR) (9, 11, 12).

Moreover, an inflammatory background in CU patients has been postulated (13). Several studies correlated the severity of the disease with an increase or positivity of biomarkers of inflammation as D-dimer (DD), C-reactive protein (CRP), and erythrocyte sedimentation rate (ESR) (13–15).

The severity, prognosis, and management of CSU vary among patients, requiring a personalized therapeutic approach. European guidelines recommend the use of antihistamines to manage the disease (1). In cases where this approach proves insufficient, omalizumab treatment may be beneficial (1). Omalizumab is a monoclonal antibody that binds free IgE in humans, preventing its interaction with receptors on mast cells and basophils, thus inhibiting degranulation and the release of products like histamine. Although there are many studies regarding the mechanism of action of omalizumab in CSU, the research on its effect on T-cell subpopulations (specifically in those involved in the autoimmune response, as Th1 and Th2) remains limited (16, 17).

The aim of the present study was to analyze using flow cytometry T lymphocyte subsets in peripheral blood of patients with CSU, to better understand the effect of omalizumab. This will allow us to identify potential biomarkers that would be useful to a more personalized management of the disease.

2 Materials and methods

2.1 Patients

We carried out a prospective study of 71 patients over the age of 18 years with CSU recruited between 2014 and 2021 at the Departments of Allergology and Dermatology Germans Trias i Pujol Hospital, Barcelona. Within this group, 33 patients were under omalizumab treatment (eight males and 25 females) and 38 (15 males and 23 females) under non-immunomodulatory drugs (treated with antihistamines; NID). Patients who initiated omalizumab treatment after inadequate response to four times the standard dose of antihistamines under medical supervision, following the European guidelines on chronic urticaria (1), were included. The dosing and administration of omalizumab followed the algorithm for CSU treatment with omalizumab established by the urticaria network from Catalonia and Balearic Islands ("Xarxa d'Urticaria Catalana i Balear") (18).

Patients under 18 years, with another allergic disease, in treatment with another biological drug or under an immunosuppressive state were excluded from the study.

Blood samples were analyzed before and after 6 months of omalizumab treatment, with informed consent obtained from all patients. Data collection was anonymized and conducted in compliance with medical research codes, following approval from Ethics Committee of our hospital (PI-20-034). From the 33 patients under omalizumab treatment, some clinical parameters were taken: associated and type of autoimmune diseases (thyroiditis, if present), associated angioedema (clinical diagnosis), score on the Urticaria Activity Score 7 (UAS 7) scale (for severity of the urticaria), and associated atopy (prick test). All subjects also underwent skin tests to inhalant allergens. Questionnaires assessing CSU control were given before and 6 months post-treatment.

Regarding the immunological study, indirect Basophil Activation Test (BAT) was conducted on 45 CSU patients (22 receiving omalizumab treatment and 23 with NID). Additionally, for the immunophenotype study, 51 patients of 71 were analyzed by flow cytometry, 27 under NID, and 24 under omalizumab treatment. A control group consisted of fifty healthy donors (HDs) from the Blood and Tissue Bank of Catalonia (BST) were included (28 females, 22 males between 21 and 36 years) (Figure 1).

An additional analysis was performed in a subgroup of 38 CSU patients (14 baseline patients and 24 post-treatment) to study lymphocyte subpopulations before and after treatment with omalizumab.

2.2 Methods

2.2.1 Skin tests (prick tests)

Prick testing was performed for the following allergens: dust mites (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*), fungi (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*), epithelial (dog and cat), tree pollen (*Cupressus sempervivens*, *Platanus acerifolia*, *Pinus radiata*, *Quercus ilex*, *Olea europea*), weeds (*Parietaria*

judaica, *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium album*, mixture of weeds pollens) and grasses (*Cynodon dactylis* and *Lolium perenniale*). When mixture of weeds pollen tests was positive, a further breakdown was performed using *Plantago ovata*, *Salso la kali* and *Mercurialis annua* (all of them from Leti Laboratories SA).

2.3 Biological samples

Blood samples were obtained through venipuncture. For the analysis of the lymphocyte subpopulations, samples were collected in an EDTA tube and were stored at room temperature and analyzed within 4h post-extraction.

ESR and DD were analyzed in plasma using DxH 900 (Beckman Coulter, Indianapolis, USA) and CRP in serum samples using AU-5800 (Beckman Coulter). Furthermore, serum parameters such as total IgE, specific IgE against hidden allergens as Anisakis, Tri a19 and Pru p3 were analyzed using immunoassay (ImmunoCAP®, Thermo Fisher-Phadia, Massachusetts, USA). Antithyroid autoantibodies were analyzed from sera using chemiluminescence (Abbott Diagnostics, Illinois, USA).

2.4 Lymphocyte subpopulations by flow cytometry

A phenotypical characterization of the T lymphocyte populations in whole peripheral blood was carried out. We used the standardized panels included in the European ENTIRE HIP-C protocol (19–21) (Table 1).

One hundred microliter of whole blood were stained for the surface markers listed in Table 2 (the majority from BD Biosciences, San José, CA, USA, except for CXCR3, CD45, and CCR6 from BioLegend, San Diego, CA). We followed the protocol of the ENTIRE HIP-C project (21).

The strategy used for the analysis of the different lymphocytes subpopulations is provided in Supplementary Figure S1.

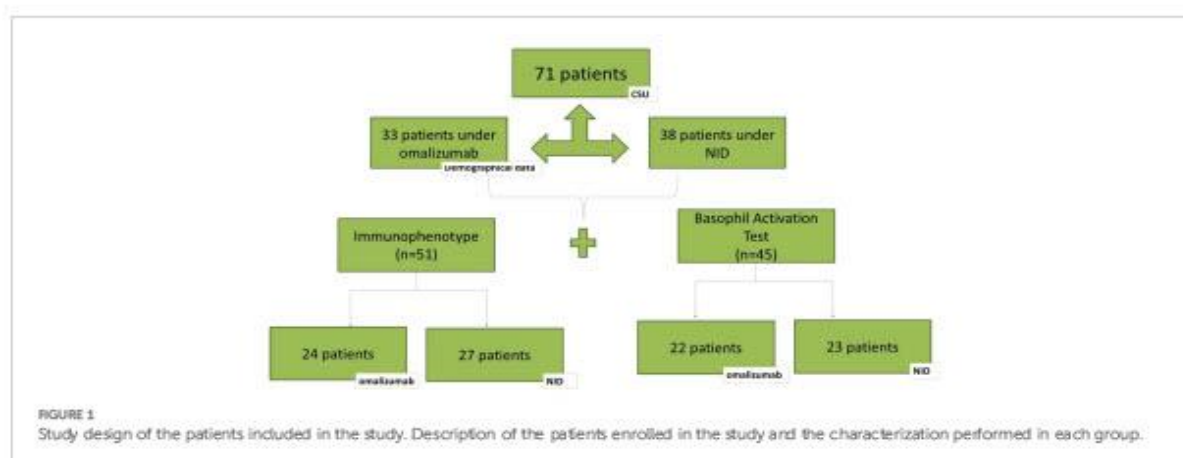


TABLE 1 Lymphocyte characterization.

Lymphocyte subpopulation	Phenotype
CD8 T-cell subsets	
CD8 ⁺ T cell	CD3 ⁺ CD8 ⁺
CD8 ⁺ naïve T cell	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁺
CD8 ⁺ Central Memory T cell (CM)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁻
CD8 ⁺ Effector Memory T cell (EM)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CCR7 ⁻ CD45RA ⁻
CD8 ⁺ Terminally differentiated T cell (TEMRA)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CCR7 ⁻ CD45RA ⁺
CD8 ⁺ activated T cell	CD3 ⁺ CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ CD38 ⁺ / CD3 ⁺ CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ CD38 ⁻
CD4 T-cell subsets	
CD4 ⁺ T cell	CD3 ⁺ CD4 ⁺
CD4 ⁺ naïve T cell	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁺
CD4 ⁺ Central Memory T cell (CM)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁻
Th1 Central Memory	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁻ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻
Th2 Central Memory	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁻ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺
Th17 Central Memory	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁻ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁺
CD4 ⁺ Effector Memory T cell (EM)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁻ CD45RA ⁻
Th1 Effector Memory	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁻ CD45RA ⁻ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻
Th2 Effector Memory	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁻ CD45RA ⁻ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺
Th17 Effector Memory	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁻ CD45RA ⁻ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁺
CD4 ⁺ Terminally differentiated T cell (TEMRA)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁻ CD45RA ⁺
CD4 ⁺ activated T cell	CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ CD38 ⁺ / CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ CD38 ⁻

2.5 Indirect basophil activation test

For the indirect BAT, seven healthy volunteers aged between 21 and 38 years old were selected. These volunteers had the 0+ blood group to avoid nonspecific reactions involving ABO antibodies in the patients' serum, and they were designated as basophil donors throughout the time of the study.

Protocol used is based on several studies involving patients diagnosed with CSU (22–24). Briefly, 50 µl of patient's serum was incubated with 50 µl of basophil donor's blood. After incubation for 15 min at 37°C, samples were lysed and washed with reagents provided by the kit. Basophils were identified using the cell surface expression of CCR3 in the Side Scatter Channel (SSC) and activated basophils according CD63 expression. Cells were acquired and analyzed using CCR3 expression acquiring a minimum of 500 total basophils in a FACSLyric cytometer (BD Biosciences). The strategy used in the analysis is provided in [Supplementary Figure S2](#).

TABLE 2 Antibodies used in flow cytometry.

Antibody	Fluorochrome
CD45	AF700
CD3	PerCP
CD8	APCH7
CD4	PerCp5
CD38	APC
HLA-DR	V500
CD45RA	PEcy7
CCR7	PE
CCR6	BV605
CXCR3	AP800

Antibodies anti-FcεRI and N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) were used as positive controls.

It was considered positive when (1) the percentage of CD63+ basophils is >5% and (2) stimulation index (SI) is ≥2 [SI = percentage of CD63+ cells induced by the patients' serum divided by the percentage of CD63+ cells induced by the negative control] (22–24).

2.6 Statistical analysis

The statistical analysis of the population was performed using univariate analysis to determine the relationship between each variable. This was achieved using the χ^2 for qualitative variables and the student *t*-test for quantitative variables. For non-parametric data, *U* Mann–Whitney test was used.

Subsequently, a multivariate analysis was performed with logistic regression. All independent variables which in the univariate analysis showed a relationship with the main variable with a *P*-value of < 0.5 were included in the model, considering that **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

Statistical analysis was performed using the GNU PSPP program version 1.2.0-g0fb4db and GraphPad Prism 7.03.

3 Results

3.1 Patients' characterization

3.1.1 Clinical characteristics

Of the 33 patients receiving omalizumab treatment, 26 patients (77.7%) were women. Eighteen patients (57%) were enrolled from the Allergy Section and 14 patients (43%) from Dermatology Department. Angioedema occurred in nine patients (30%).

Antithyroid antibodies were found in five patients (16%). Nine patients had concomitant autoimmune disease (ulcerative colitis, autoimmune thyroiditis, type 1 diabetes, vitiligo, or psoriasis). The majority were women (seven of nine), with four experiencing angioedema and two having atopy. One patient had a dose reduction, and one did not respond to the treatment.

More than half of the patients (52.63%) had positive skin tests to inhalant allergens (mostly to dust mites) and 18.2% had positive specific IgE to anisakis, but no positivity to other hidden allergens such as Pru p3 or Tri a 19.

3.1.2 UAS 7 score and response to omalizumab

All patients started omalizumab and 26 patients (79%) completed the treatment course. Seven patients (21%) discontinued treatment due to lack of efficacy.

The mean UAS 7 score before omalizumab treatment was 30.1 (from 28 to 42; severe). When comparing the UAS 7 score results before (UAS 7 = 30) and after omalizumab treatment (UAS 7 = 5), a notable reduction in scores was observed ($p < 0.0001$), indicating a significant enhancement in the patient's quality of life. Additionally, the cohort was stratified into those who did not complete the treatment due to inefficacy and those who complete the full dose. Changes in the UAS 7 score after initiating omalizumab remained statistically significant ($p < 0.05$), with the group that completed the treatment showing a lower UAS7 score (Supplementary Table S1).

3.1.3 Inflammation markers and serum proteins

CSU patients had significantly elevated serum IgE levels despite omalizumab treatment (mean IgE in omalizumab patients: 362.87 ± 902.5 kU/L; mean IgE in NID patients: 157 ± 306.3 kU/L; normal range <100 kU/L).

In our study, there were no differences in others serum markers, except for C-reactive protein (CRP), where higher levels were seen in patients treated with omalizumab. (Supplementary Table S2).

3.2 Immune profile

3.2.1 Indirect BAT test is not affected by omalizumab treatment

Initially, the BAT technique was validated using 10 healthy controls (being all of them negative).

Subsequently, sera from the various patient groups were analysed ($n = 45$), with only 34% yielding positive BAT result. Among the positive cases, only eight patients were undergoing omalizumab treatment. No correlation could be identified between BAT positivity and anti-IgE treatment.

3.2.2 Patients receiving omalizumab treatment exhibited a distinct profile in T-cell subsets compared to those undergoing treatment with NIDs

In the analysis of T lymphocyte subpopulations and phenotype characterization, we analyzed 24 patients who had been undergoing omalizumab treatment for 6 months and 27 patients under NIDs. Both groups were then compared with a control group of 50 healthy individuals. All the changes in the percentages and absolute counts of different T lymphocyte subpopulations between groups are provided in Supplementary Tables S3, S4.

In relation to CD4⁺ T lymphocytes, patients with CSU under NID treatment had higher percentages of naïve cells and lower

percentages of central memory subsets than HD (naïve CD4: 58.90 [23.6–74.9] vs. 42 [15.7–74.9] %, $p = 0.0001$, and central memory CD4: 29.10 [13.4–61.5] vs. 39.95 [2.1–58.3] %, $p = 0.0001$; Figure 2). In contrast, in treatment with omalizumab there were lower percentages of naïve cells and higher of central memory cells, when compared to NID, restoring values similar to those found in HD (naïve CD4: 43.40 [22.1–62] vs. 58.90 [23.6–71.9] %, $p = 0.0025$, and central memory CD4: 36.35 [19.5–62.9] vs. 29.10 [13.4–61.5] %, $p = 0.0020$; Figure 2).

Regarding functional T subsets (Figure 3), in CSU, there was a decrease of the percentage of Th1 cells when compared with HD, which was reverted in the treatment with omalizumab. On the other hand, no differences were observed between HD and NID patients concerning Th2 cells, but, interestingly, their percentages were increased in the treatment with omalizumab. In contrast, percentages of Th17 cells were decreased in CSU patients with NID but omalizumab had not effect on them.

In CD8⁺ T cells, patients under treatment with omalizumab had lower percentages of naïve cells and higher percentages of the effector subsets than NID patients and HD (naïve CD8: 13.40 [6.5–48.2] vs. 38.75 [10.5–70.7] %, $p = 0.0002$, and effector CD8: 45.60 [6.6–73.1] vs. (29.70 [3.5–66.70] %, $p = 0.0007$; Figure 4).

When we analyzed activation markers, we found that the percentages of CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing CD38 but not HLA-DR were increased in CSU patients treated with NID and not affected in omalizumab treatment. Moreover, CD4⁺ T cells expressing HLA-DR were lower in peripheral blood of patients with CSU (Figure 5).

Moreover, we analyzed if there was a correlation between inflammatory markers, presence of autoantibodies and indirect BAT positivity with T-cell subsets. No correlation was found (data not shown).

3.2.3 Omalizumab induces a decrease in naïve CD8⁺ T cells and an increase of Th1 and Th2 subsets

To confirm the correlation between the impact of anti-IgE treatment and potential alterations in lymphocyte subpopulations, T lymphocyte subpopulations were analysed in CSU patients undergoing omalizumab before starting and 6 months after treatment with it ($n = 38$, 14 baseline patients and 24 post-treatment). Prior to treatment, patients displayed elevated levels of naïve CD8⁺ T cells (41.2 [10.7–54.5] vs. 13.4 [6.5–48.2] %, $p = 0.024$) and total CD8⁺ T cells (25.45 [16.8–41.4] vs. 22.15 [13.1–40.4] %, $p = 0.034$) (Figure 6).

Regarding CD4⁺ T-cell subsets, although statistically significant differences were not observed, there was a notable trend towards an increase in activated CD4⁺ HLA-DR⁺CD38⁺ T cells and the subpopulations of Th1 effector memory and Th2 central memory in patients once they are under treatment with omalizumab (Supplementary Figure S3).

Finally, we studied lymphocyte subpopulations in a subgroup of nine CSU patients before and after treatment. Although no significant differences were identified, likely attributed to the small sample size, a tendency toward a decrease in CD4⁺HLA-

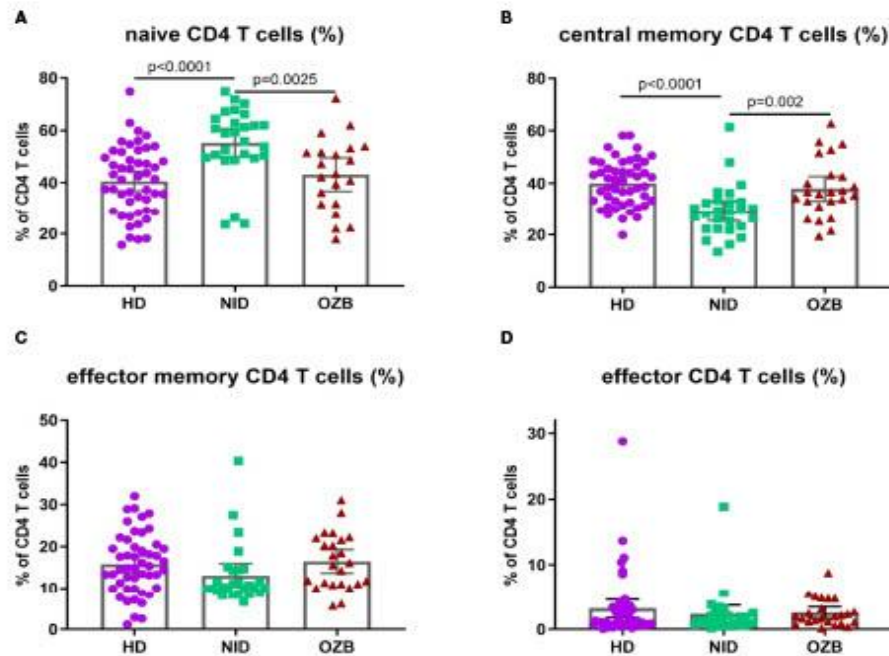


FIGURE 2
Differences in the percentages of naive and central memory CD4 T cells were observed in patients with CSU treated with omalizumab when compared to those treated with NID or to HD. Percentages of (A) naive, (B) central memory, (C) effector memory, and (D) effector CD4 T cells in peripheral blood of HD, NID, and CSU patients under omalizumab treatment. CSU, chronic spontaneous urticaria; HD, healthy donors ($n = 50$); NID, non-immunomodulatory drugs ($n = 27$); OZB, omalizumab ($n = 24$).

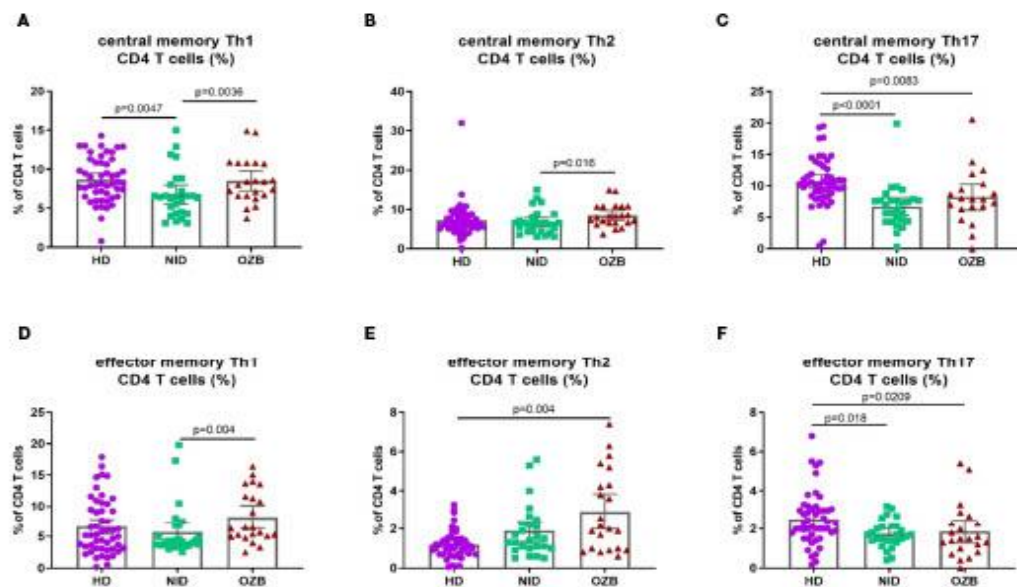
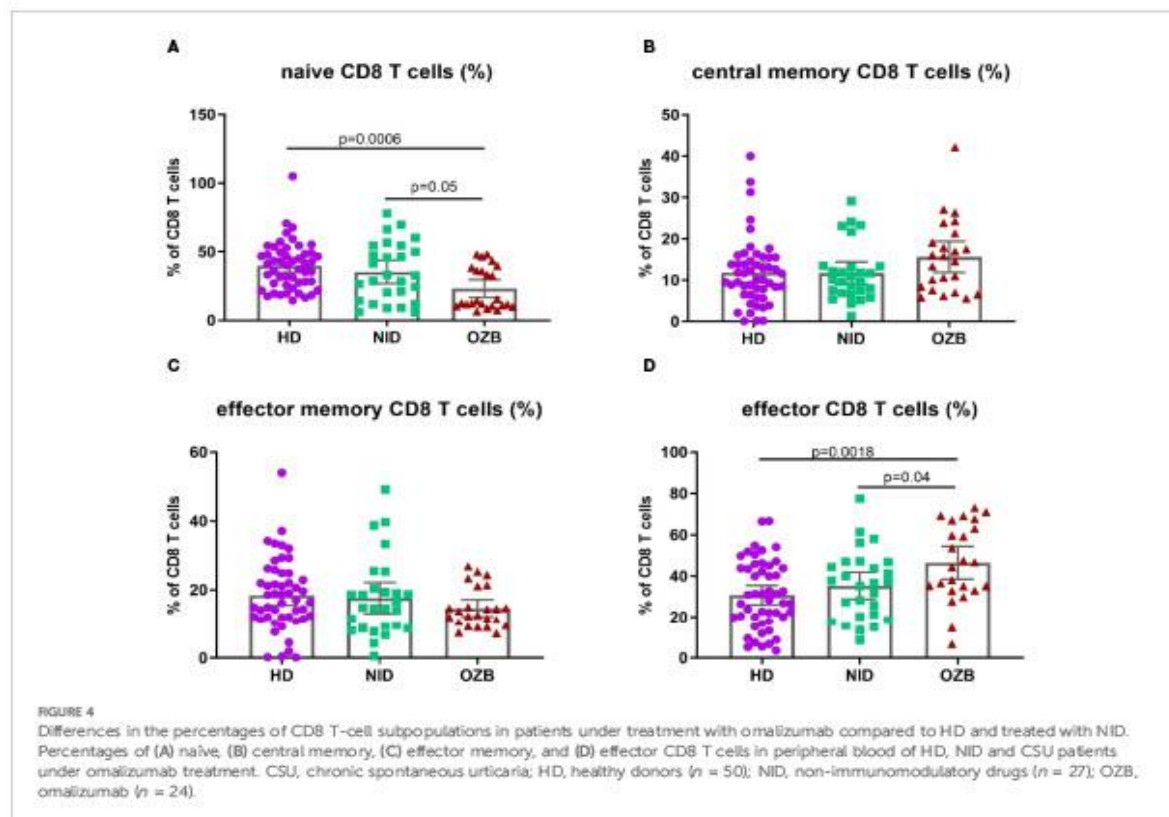


FIGURE 3
Th1 and Th2, but not Th17; CD4 T subsets are affected by treatment with omalizumab. Percentages of (A) central memory Th1, (B) central memory Th2, (C) central memory Th17, (D) effector memory Th1, (E) effector memory Th2, and (F) effector memory Th17 T cells in peripheral blood of HD, NID, and CSU patients under omalizumab treatment. CSU, chronic spontaneous urticaria; HD, healthy donors ($n = 50$); NID, non-immunomodulatory drugs ($n = 27$); OZB, omalizumab ($n = 24$).



DR⁺CD38⁺ T cells and an increase in central and effector Th1 memory subpopulations, as well as activated CD4⁺ HLA-DR⁺CD38⁺ T cells, was observed during the treatment with omalizumab (Supplementary Figure S4).

4 Discussion

The main goal of our study was to investigate cellular immunity of patients with CSU and its relationship with the response to omalizumab treatment.

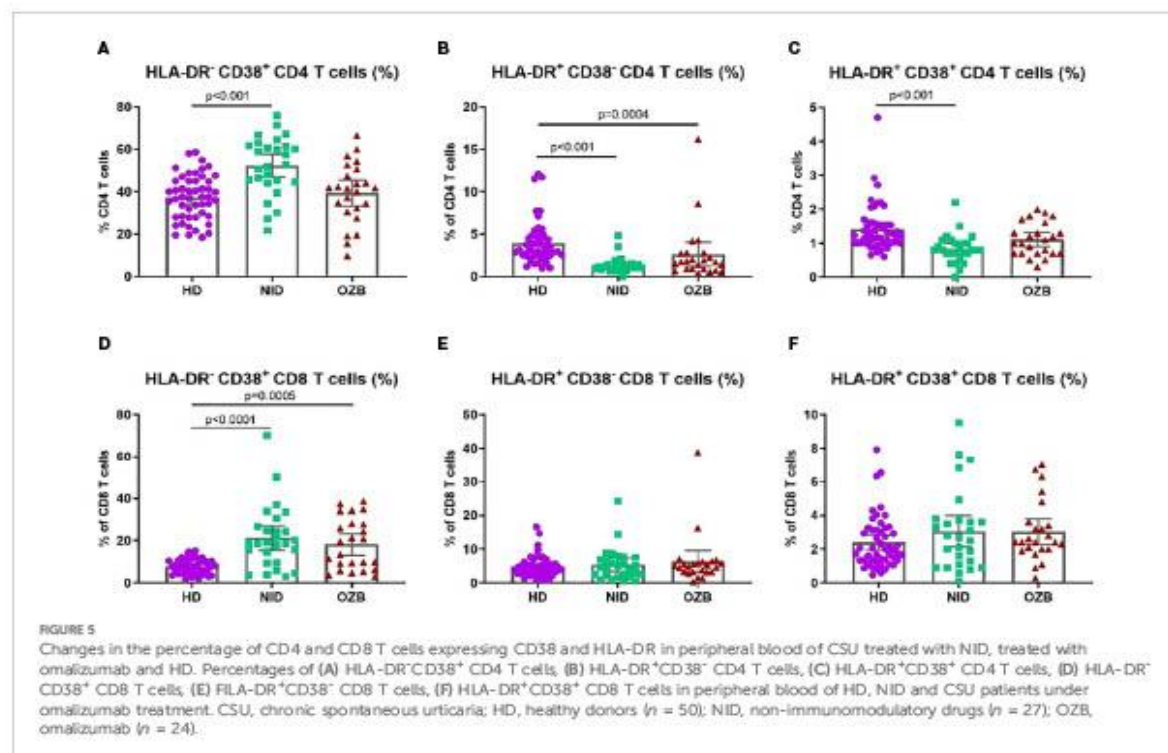
Managing and monitoring patients with CSU is challenging. Therefore, treatment with a monoclonal antibody as omalizumab is essential to prevent specific IgE from binding to FcεRI on mast cells and enhance the patient's quality of life. Most of our patients responded positively to treatment although in 40% of them, a dose increase was necessary. These results were also reflected in the UAS 7 score, where scores significantly decreased after omalizumab treatment, confirming the improvement of patients once treatment was initiated (1, 25).

Regarding immune response and the impact of omalizumab on the immune system, several studies have indicated a correlation between indirect BAT results and the response to anti-IgE treatment (16, 26, 27). The indirect BAT has established itself as a specific and sensitive *in-vitro* test to identify autoantibodies IgG in

patients with CAU (6). Several studies have investigated the usefulness of utilizing BAT as a tool for diagnosis and monitoring patients with CSU, yet it remains a matter of controversy (28). In our cohort, only eight patients had positive indirect BAT results, of which three were under omalizumab treatment. In the present study, indirect BAT has demonstrated to be useless; and should not be introduced in the clinical practice.

Although omalizumab is an effective treatment for CSU patients, its mechanism of action remains elusive. Effects on mast cell activation, downregulation of IgE receptors, reversal basopenia or reducing IgG autoantibodies against IgE or its receptor, have been described but are not yet fully understood (25). Furthermore, the potential influence on T cells remains unknown. Studies in cohorts with other allergic diseases (such as asthma) could be useful to assess the effect of omalizumab on adaptive immune responses.

Regarding the involvement of T cells in the pathogenesis of CSU, it has been described that, in skin biopsies of CSU patients, there is a perivascular non-necrotizing cellular infiltration with predominance of CD4⁺ T cells, not only of Th2 but also of Th1 and Th17 subsets (29). Moreover, these CD4⁺ T cells found in the skin expressed high levels of HLA-DR (12). Here, we described that patients with CSU had in peripheral blood low percentages of not only CD4⁺ T cells expressing HLA-DR but also Th1, Th2, and Th17 cells. These results support that these CD4⁺ T cells migrate to the skin where they participate in the pathogenesis of the wheal. Also,



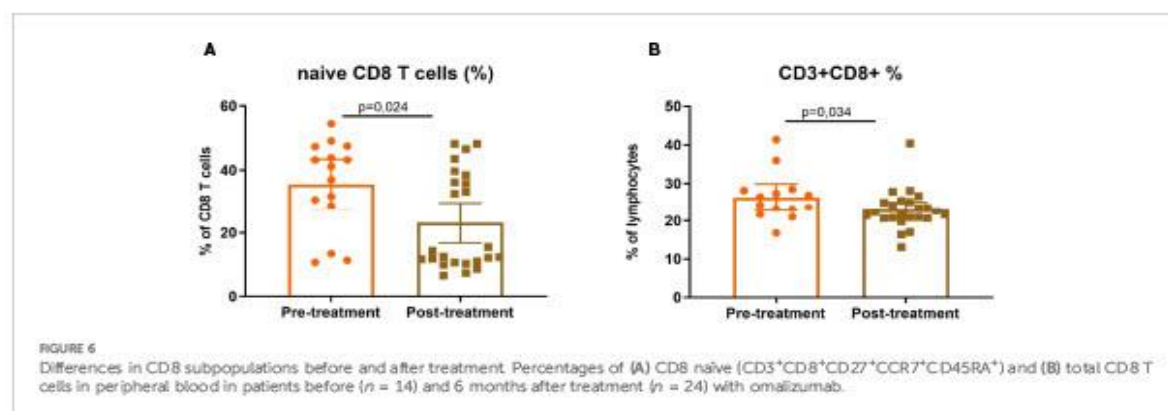
we found an increase in the percentage of naïve T cells and a decrease of memory subsets in the peripheral blood of patients with CSU. Although, as far as we know, this is the first study analyzing naïve and memory T-cell subsets in patients with CSU, these results also support an infiltration of memory T cells in the skin lesions.

Interestingly, treatment with omalizumab induced changes in naïve and memory subsets of T cells, as well as in Th1 and Th2 subsets, in most of the cases restoring values like those found in the HD group. It has been described that omalizumab decreases the expression of FcεRI on dendritic cells (30). Moreover, it is known that dendritic cells are key players in the differentiation of Th1 and

Th2 subsets. Although more studies should be performed to better understand the mechanism of action of omalizumab in those T-cell subsets, an effect of omalizumab in dendritic cells could explain why under the treatment the percentages of Th1 and Th2 subsets are restored to levels like HD.

However, the analysis of activation markers and Th17 cells could be used to characterize patients with CSU but are not modified by treatment with omalizumab, so they are not of interest for our goal of monitoring of the treatment.

Despite the findings, our study has limitations too. It is a preliminary study with a small cohort of CSU patients treated



with omalizumab, and these findings should be validated in a larger cohort. Additionally, although we described changes in T-cell subpopulations induced by omalizumab, the mechanism of how the drug modifies these T-cell phenotypes is still not fully clear. Further studies should be assessed in the future to better characterize it.

In summary, in this paper, we postulate that changes in the T lymphocyte subpopulations can be used as putative markers of the treatment effect. Hence, during the follow-up of patients starting treatment with omalizumab, we can expect a decrease in the percentage of naïve and increase of central memory CD4⁺ T cells, a decrease in naïve and increase of effector CD8⁺ T-cell subsets, as well as an increase of Th1 and Th2 cells but the mechanism of how omalizumab modifies T-cell phenotype is not fully understood. Further studies are needed to elucidate its mechanism of action in T cells.

5 Conclusion

The analysis by flow cytometry of T-cell subsets in peripheral blood of CSU patients undergoing treatment with omalizumab would be useful in the clinical practice to better characterize the effect of the treatment in each patient.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. Further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Ethics statement

The studies involving humans were approved by Ethics committee of Germans Trias i Pujol Hospital. The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

CL: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Software, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. ND: Conceptualization, Data curation, Investigation, Methodology, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing. IB: Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing. AR: Writing – original draft, Writing – review & editing. BQ: Data curation, Writing – review & editing. MB: Data curation, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing.

YJ: Writing – review & editing. CP: Data curation, Investigation, Writing – review & editing. SM: Writing – review & editing. EM: Data curation, Formal analysis, Methodology, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. AT: Formal analysis, Investigation, Methodology, Resources, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This work has been partially funded by the award given by the Agency for Management of University and Research Grants of the Government of Catalonia (AGAUR; reference 2021SGR00002) for the period 2012–2024. And partially supported by a grant from the JMC Legacy Research Fund of Germans Trias i Pujol University Hospital. The sponsor had no role in the study design, data collection and analysis, interpretation of results, the preparation of the manuscript, the decision to submit the manuscript for publication, and the writing of the manuscript.

Acknowledgments

Special thanks to Mr. Armando Ruiz and Ms. Aroa Pardell from the Immunology Division from the Hospital Germans Trias for technical assistance. The authors thank Marco A. Fernández of the Cytometry Facility of IGTP for his continuous help and suggestions.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2024.1413233/full#supplementary-material>

References

- Zuberbier T, Abdul Latiff AH, Abuzaikouk M, Aquilina S, Asero R, Baker D, et al. The international EAACI/GA²LEN/EuroGuiDerm/APAAACI guideline for the definition, classification, diagnosis, and management of urticaria. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. (2022) 77:734–6. doi: 10.1111/all.15090
- Nosbaum A, Auguy F, Nicolas JF, Bérard F. Pathophysiology of urticaria. *Ann Dermatol Venerol*. (2014) 141:S559–64. doi: 10.1016/S0151-9638(14)70158-9
- Hennino A, Bérard F, Guillot I, Saad N, Rozières A, Nicolas JF. Pathophysiology of urticaria. *Clin Rev Allergy Immunol*. (2006) 30:3–11. doi: 10.1385/CRIAI.30.1
- Confino-Cohen R, Chodick G, Shalev V, Leshno M, Kimhi O, Goldberg A. Chronic urticaria and autoimmunity: Associations found in a large population study. *J Allergy Clin Immunol*. (2012) 129:1307–13. doi: 10.1016/j.jaci.2012.01.043
- Bracken SJ, Abraham S, MacLeod AS. Autoimmune theories of chronic spontaneous urticaria. *Front Immunol*. (2019) 10:1–10. doi: 10.3389/fimmu.2019.00627
- Ferrer M, Bartra J, Giménez-Arnau A, Jauregui I, Labrador-Horrillo M, Ortiz de Prutos J, et al. Management of urticaria: Not too complicated, not too simple. *Clin Exp Allergy*. (2015) 45:731–43. doi: 10.1111/cea.12465
- Kolchir P, Borzova E, Gratian C, Asero R, Pogorelov D, Maurer M. Autoimmune comorbidity in chronic spontaneous urticaria: A systematic review. *Autoimmun Rev*. (2017) 16:1196–208. doi: 10.1016/j.autrev.2017.10.003
- Huian Z, Rumziang L, Bihua L, Qing G. Role of the subgroups of T, B, natural killer lymphocyte and serum levels of interleukin-15, interleukin-21 and immunoglobulin e in the pathogenesis of urticaria. *J Dermatol*. (2010) 37:441–7. doi: 10.1111/j.1346-8138.2010.00805.x
- Chen W, Si S, Wang X, Liu J, Xu B, Yin M, et al. The profiles of T lymphocytes and subsets in peripheral blood of patients with chronic idiopathic urticaria. *Int J Clin Exp Pathol*. (2016) 9:7428–35.
- Hidvégi B, Nagy E, Szabó T, Temesvári E, Marschalkó M, Kárpáti S, et al. Correlation between T-cell and mast cell activity in patients with chronic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol*. (2003) 132:177–82. doi: 10.1159/000073719
- Auyeung P, Mittig D, Hodgkin PD, Harrison LC. Autoreactive T cells in chronic spontaneous urticaria target the IgE Fc receptor α subunit. *J Allergy Clin Immunol*. (2016) 138:761–768.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2016.04.036
- Mekori YA, Giorno RC, Anderson P, Kohler PF. Lymphocyte subpopulations in the skin of patients with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. (1983) 72:681–4. doi: 10.1016/0091-6749(83)90629-2
- Kolchir P, André F, Church MK, Maurer M, Metz M. Potential blood biomarkers in chronic spontaneous urticaria. *Clin Exp Allergy*. (2017) 47:19–36. doi: 10.1111/cea.12870
- Fok JS, Kolchir P, Church MK, Maurer M. Predictors of treatment response in chronic spontaneous urticaria. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. (2021) 76:2965–81. doi: 10.1111/all.14757
- Puxeddu I, Petrelli F, Angelotti F, Croia C, Migliorini P. Biomarkers in chronic spontaneous urticaria: Current targets and clinical implications. *J Asthma Allergy*. (2019) 12:285–95. doi: 10.2147/JAA
- Dexa G, Bertolin-Colilla M, Pujol RM, Curto-Barredo L, Soto D, García M, et al. Basophil Fc ϵ RI expression in chronic spontaneous urticaria: A potential immunological predictor of response to omalizumab therapy. *Acta Derm Venereol*. (2017) 97:698–704. doi: 10.2340/00015555-2654
- Hon KL, Leung AKC, Ng WGG, Loo SK. Chronic urticaria: an overview of treatment and recent patents. *Recent Pat Inflammation Allergy Drug Discovery*. (2019) 13:27–37. doi: 10.2174/1872213X13666190328164931
- Sperino J, Curto Barredo L, Rosas Muñoz E, Figueras Nart I, Serra Baldrich E, Bonfill-Orti M, et al. Algorithm for treatment of chronic spontaneous urticaria with omalizumab. *Actas Dermosifiliogr*. (2018) 109:771–6. doi: 10.1016/j.ad.2018.07.005
- Popadic D, Anegón I, Baeten D, Eibel H, Giese T, Marits P, et al. Predictive immunomonitoring-The COST ENTIRE initiative. *Clin Immunol*. (2013) 147:23–6. doi: 10.1016/j.clim.2013.01.013
- Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat Rev Immunol*. (2012) 12:191–200. doi: 10.1038/nri3158
- Oras A, Quirant-Sánchez B, Popadic D, Thunberg S, Winqvist O, Heck S, et al. Comprehensive flow cytometric reference intervals of leukocyte subsets from six study centers across Europe. *Clin Exp Immunol*. (2020) 202:363–78. doi: 10.1111/cei.13491
- Marcelino J, Baumann K, Skov PS, Pereira Santos MC, Wysocki I, Scheff J, et al. What basophil testing tells us about CSU patients – results of the CORSA study. *Front Immunol*. (2021) 12:1–9. doi: 10.3389/fimmu.2021.742470
- Curto-Barredo L, Yelamos J, Gimeno R, Mojal S, Pujol RM, Giménez-Arnau A. Basophil activation test identifies the patients with chronic spontaneous urticaria suffering the most active disease. *Immunity Inflammation Dis*. (2016) 4:441–5. doi: 10.1002/sid.3125
- Santos AF, Alpan O, Hoffmann HJ. Basophil activation test: Mechanisms and considerations for use in clinical trials and clinical practice. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. (2021) 76:2420–32. doi: 10.1111/all.14747
- Kaplan AP, Giménez-Arnau AM, Saini SS. Mechanisms of action that contribute to efficacy of omalizumab in chronic spontaneous urticaria. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. (2017) 72:519–33. doi: 10.1111/all.2017.72.issue-4
- Gerick J, Metz M, Ohanyan T, Weller K, Altrichter S, Skov PS, et al. Serum autoreactivity predicts time to response to omalizumab therapy in chronic spontaneous urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. (2017) 139:1059–1061.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2016.07.047
- Kurt E, Aktas A, Aksu K, Keren M, Dokumacioglu A, Goss CH, et al. Autologous serum skin test response in chronic spontaneous urticaria and respiratory diseases and its relationship with serum interleukin-18 level. *Arch Dermatol Res*. (2011) 303:643–9. doi: 10.1007/s00403-011-1144-x
- Rodríguez-Trabado A, Fernández-Pereira LM, Romero-Chala S, García-Trujillo JA, Címaro Híjón C. Monitoring omalizumab treatment efficacy in chronic urticaria by the basophil activation test. *Allergol Immunopathol (Madr)*. (2012) 40:390–2. doi: 10.1016/j.aller.2011.09.009
- Giménez-Arnau AM, DeMontejo L, Asero R, Cugno M, Kulthanan K, Yanase Y, et al. The pathogenesis of chronic spontaneous urticaria: the role of infiltrating cells. *J Allergy Clin Immunol Pract*. (2021) 9:2195–208. doi: 10.1016/j.jaip.2021.03.033
- Holgate ST, Djukanović R, Casale T, Bousquet J. Anti-immunoglobulin E treatment with omalizumab in allergic diseases: an update on anti-inflammatory activity and clinical efficacy. *Clin Exp Allergy*. (2005) 35:408–16. doi: 10.1111/j.1365-2222.2005.02191.x

