

R. 19199

X

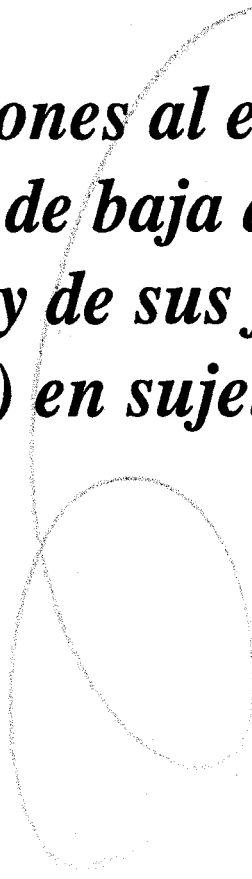
T.D.
6/128

UNIVERSIDAD DE SEVILLA - FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina – Servicio de Inmunología y Alergia

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
SERVICIO DE INMUNOLOGÍA Y ALERGIA
C/ S. Francisco de Asís, 16
41013 Sevilla, España
Tel. 95 421 10 00
Fax 95 421 10 01
e-mail: semin@us.es
Internet: <http://www.us.es/semin>
Código de barras: 93 187

Anna Raffette

**«Aportaciones al estudio
de los receptores de baja afinidad para
la IgE (CD23) y de sus fragmentos
solubles (CD23s) en sujetos atópicos»**



D. José Carlos García Ortiz

**Facultad de Medicina
Universidad de Sevilla
Departamento de Medicina
Servicio de Inmunología y Alergia**

Título: "Aportaciones al estudio de los receptores de baja afinidad para la IgE (CD23) y de sus fragmentos solubles (CD23s) en sujetos atópicos"

Trabajo de investigación realizado por D. JOSE CARLOS GARCIA ORTIZ para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.



Servicio Andaluz de Salud.
HOSPITAL UNIVERSITARIO
"VIRGEN MACARENA"
SEVILLA

JUNTA DE ANDALUCIA
Consejería de Salud

JOSE CONDE HERNANDEZ, PROFESOR TITULAR DE PATOLOGIA GENERAL Y PROPEDEUTICA CLINICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICA: que D. JOSE CARLOS GARCIA ORTIZ, ha realizado el trabajo "Aportaciones al estudio de los receptores de baja afinidad para la IgE y de sus fragmentos solubles en sujetos atópicos", bajo su dirección, el cual ha sido codirigido por el Dr. FRANCISCO JAVIER MONTESEIRIN MATEO, y que reúne todos los requisitos necesarios, para ser presentado y defendido como Tesis doctoral.

Y PARA QUE CONSTE Y SURTA LOS EFECTOS OPORTUNOS, EXPIDO EL PRESENTE EN SEVILLA A DOCE DE ENERO DE MIL NOVECIENTOS NOVENTA Y TRES.

DEDICATORIA

A mis padres,
a Sonsoles,
a Smeagle.

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. D José Conde Hernández, por su dedicación a la especialidad y su disponibilidad siempre que lo necesité.

Gracias al Dr. D. Francisco Javier Monteseirín Mateo, por su apoyo constante, sus consejos y su imprescindible ayuda en la realización de esta Tesis.

Al Dr. D. Joaquín González Pol, por su enseñanza clínica y por haberme permitido disponer del tiempo necesario para la realización del estudio.

A todos los compañeros Residentes del Servicio de Inmunología y Alergia del Hospital Virgen Macarena por su incondicional colaboración en todo lo que les solicité.

Especialmente a los doctores D. Pedro Angel Galindo Bonilla y D. Pedro Bobadilla González así como a la Dra. D^a. Carmen Reinares Tey por su ayuda en las determinaciones de laboratorio.

Muy especialmente a la Dra. D^a. Estrella LLamas por su desinteresada e imprescindible colaboración en el estudio de citometría de flujo.

A mis compañeros de promoción de la especialidad de Alergología los doctores D. Pedro Bobadilla González, D. Pedro Angel Galindo Bonilla y D. Gabriel Sosa Saavedra.

A las enfermeras Reme, Lola y Carmen y a las auxiliares Mercedes y Manoli por su disposición en cuanto necesité.

INDICE

INDICE

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	5
INDICE.....	8
CAPITULO I: INTRODUCCION.....	13
1.- REGULACION DE LA SINTESIS DE LA IgE.....	16
- A) PAPEL DE LAS CITOCINAS.....	17
- B) INTERACCION CELULA-CELULA.....	21
2.- RESEÑA HISTORICA SOBRE EL FcεR2/CD23.....	25
3.- ESTRUCTURA MOLECULAR DEL FcεR2/CD23.....	28
- VARIEDADES MOLECULARES DEL FcεR2/CD23.....	34
- FcεR2/CD23 Y HLA.....	35
4.- INTERACCION IgE-FcεR2/CD23.....	36
- A) LUGAR DE UNION DEL FcεR2/CD23 A LA IgE.....	36
- B) LUGAR DE UNION DE LA IgE AL FcεR2/CD23.....	39
5.- EL FcεR2/CD23 SOLUBLE Y SU ESTRUCTURA MOLECULAR....	42
- CD23 SOLUBLE Y OTROS FACTORES QUE SE UNEN A LA IgE..	44
6.- GEN DEL FcεR2/CD23.....	46
7.- CELULAS QUE EXPRESAN CD23. ALGUNOS ASPECTOS	
RELACIONADOS CON LA ATOPIA.....	48
- LINFOCITOS B.....	48
- LINFOCITOS T.....	51
- MONOCITOS/MACROFAGOS.....	53
- EOSINOFILOS.....	53
- CELULAS DE LANGERHANS.....	54

	10
8.- REGULACION DE LA PRODUCCION DE CD23/CD23 SOLUBLE....	55
- 1- A) POOL DE CELULAS FcεRII/CD23.....	55
B) REGULACION DE FcεRII/CD23 POR CITOCINAS Y OTROS FACTORES.....	56
C) REGULACION DEL FcεRII E INTERACCION CELULAR...	62
- 2- RAZON DE DIVISION DEL FcεRII/CD23.....	63
- 3- ACLARAMIENTO DE LOS CD23s.....	64
9.- FUNCION DEL FcεRII/CD23.....	65
- 1- REGULACION DE CRECIMIENTO DE LAS CELULAS B.....	65
- 2- REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE CELULAS B.....	67
- 3- ADHESION CELULAR.....	67
- 4- PRESENTACION DE ANTIGENO.....	68
- 5- CITOTOXICIDAD MEDIADA POR IgE E INFLAMACION.....	69
- 6- RESPUESTA IgE.....	71
10.- FUNCION DEL CD23 SOLUBLE.....	74
- 1- REGULACION DEL CRECIMIENTO DE CELULAS B.....	74
- 2- FACTOR DE DIFERENCIACION DE CELULAS B Y T.....	76
- 3- INHIBICION DE LA MIGRACION DE MACROFAGOS.....	76
- 4- REGULACION DE LA SINTESIS DE IgE.....	76
- MECANISMOS DE ACCION DEL ANTI-CD23 EN LA SINTESIS DE IgE.....	79
- ¿EXISTE RELACION CAUSAL ENTRE EL CD23 Y LA PRODUCCION DE LA IgE?.....	80
11.- SIGNIFICADO CLINICO DEL FcεRII/CD23.....	83
12.- JUSTIFICACION DE LA TESIS.....	86
CAPITULO II: MATERIAL Y METODOS.....	90
I- PACIENTES Y CONTROLES.....	91

	11
1.- PACIENTES DEL ESTUDIO.....	91
A- CONDICIONES DE EXTRACCION DEL SUERO.....	94
B- ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS.....	95
2.- CONTROLES NORMALES.....	96
A- CONTROLES DEL CD23 SOLUBLE.....	96
B- CONTROLES DEL ESTUDIO EN CELULAS.....	97
II- TEST CUTANEOS.....	98
III- ANTIGENOS.....	100
IV- DETERMINACION DE IgE TOTAL.....	101
V- DETERMINACION DE IgG4 TOTAL.....	105
VI- DETERMINACION DE CD23s.....	108
VII- ESTUDIO DE LAS SUBPOBLACIONES CELULARES.....	113
1.- CITOMETRIA DE FLUJO. FUNDAMENTO.....	113
2.- SEPARACION DE LINFOCITOS.....	114
3.- MATERIAL.....	115
4.- ANTICUERPOS MONOCLONALES UTILIZADOS.....	115
5.- MARCAJE DE CELULAS.....	116
6.- DETERMINACION DEL NUMERO DE ANTIGENOS.....	117
VIII- METODOLOGIA ESTADISTICA.....	118
CAPITULO III: RESULTADOS.....	119
I- ESTUDIO EN SUERO.....	121
A- NIVEL SERICO DE CD23s.....	121
1.- CONTROLES SANOS.....	121
2.- RINITIS.....	121
3.- ASMA.....	122
4.- RINITIS Y ASMA.....	122

5.- DERMATITIS ATOPICA.....	123
6.- COMPARACION ENTRE PATOLOGIAS ALERGICAS.....	123
7.- CD23s Y EDAD.....	124
8.- CD23s Y NUMERO DE SENSIBILIZACIONES.....	125
9.- CD23s, SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD Y AÑOS DE EVOLUCION.....	125
B- CORRELACION DEL CD23s CON LA IgE TOTAL.....	126
C- CORRELACION DEL CD23s CON LA IgG4 TOTAL.....	127
II- ESTUDIO CELULAR.....	128
1.- VALORES DE LA IgE TOTAL Y CD23s.....	128
2.- EXPRESION DEL FcεRII/CD23 EN LINFOCITOS.....	130
1- LINFOCITOS TOTALES.....	130
2- LINFOCITOS B.....	132
3- LINFOCITOS T HELPER.....	132
4- LINFOCITOS T SUPRESORES.....	134
3.- CORRELACION DEL CD23s Y DE LA IgE TOTAL CON LOS LINFOCITOS FcεRII/CD23+.....	136
4.- CORRELACION DE LAS DISTINTAS POBLACIONES CD23+ ENTRE SI.....	137
5.- INFLUENCIA DE LA EDAD Y DE LOS ANOS DE EVOLUCION DE LA ENFERMEDAD EN LAS PO- BLACIONES FcεRII/CD23s.....	139
III- TABLAS, FOTOGRAFIAS Y FIGURAS.....	140
CAPITULO IV: DISCUSION.....	189
CAPITULO V: RESUMEN.....	210
CAPITULO VI: CONCLUSIONES.....	215

CAPITULO I:

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La descripción de la existencia en el suero de un factor capaz de mediar una reacción alérgica, fue realizada por primera vez en 1921 por Prausnitz y Küstner. La inyección de suero de una persona alérgica al pescado (Küstner) en la piel de otra (Prausnitz) y la subsiguiente aplicación de un extracto de pescado en el mismo sitio de la aplicación del suero, llevó a la aparición de una reacción eritematosa alérgica. El factor sérico causante de esta reacción fue denominado reagina. La reagina humana, hoy inmunoglobulina E (IgE), fue descubierta por K. y T. Ishizaka en 1966 al aislarla del suero de sujetos alérgicos a la ambrosía.

Hoy es un hecho bien conocido que, en las enfermedades alérgicas, los niveles séricos de IgE a menudo están anormalmente elevados en respuesta a los diversos antígenos (alergenos), de hecho la enfermedad humana más común asociada con incrementos de la IgE es la atopia; también se sabe que la IgE es decisiva a la hora de causar síntomas alérgicos esencialmente por dos funciones principales. En primer lugar, tiene un papel importante en la regulación de su propia síntesis actuando a nivel linfocitario, hecho bastante complejo y aún no totalmente aclarado. En segundo lugar, la IgE tiene la capacidad de fijarse, por medio de su fragmento Fc, a células que tienen un papel importante en

el desencadenamiento de la inflamación alérgica.

En este sentido, se han descrito dos tipos de receptores celulares capaces de ligar la IgE: el clásico receptor de alta afinidad (FceRI) de mastocitos y basófilos, y el más recientemente descubierto receptor de baja afinidad (o FceRII/CD23) que aparece en células como linfocitos, eosinófilos o plaquetas.

Por otra parte, a pesar de que el descubrimiento de la IgE ha sido relativamente reciente, los mecanismos fisiopatológicos que media esta inmunoglobulina en las reacciones de hipersensibilidad están en la actualidad bastante definidos. Otra cuestión bien diferente ocurre cuando tratamos el tema de la regulación de la síntesis de la IgE, donde los conocimientos más recientes lo único que demuestran es nuestra ignorancia sobre el sistema, por lo demás, sin duda, altamente complejo.

1- REGULACION DE LA SINTESIS DE LA IgE

Los mecanismos que regulan la síntesis de IgE en humanos todavía se conocen pobremente debido a que no son factibles los estudios "in vivo" análogos a los de roedores. Existen además dificultades para encontrar un modelo experimental adecuado, ya que la hiperproducción de IgE viene condicionada por mecanismos genéticos y regulada por mecanismos inmunológicos complejos en los que participan diferentes tipos celulares y productos solubles secretados por estas células. Esto hace que la mayoría de los trabajos estén realizados estudiando aspectos muy parciales de la regulación de la síntesis de IgE.

Actualmente se acepta que los individuos atópicos tienen una predisposición genética para producir cantidades anormalmente elevadas de IgE cuando se enfrentan a dosis bajas de diversos alérgenos, en relación a la población normal, y se piensa que esa facilidad que tienen los enfermos atópicos para generar respuestas de IgE se debería a alteraciones en el control de esta inmunoglobulina. Tada (1), en la década de los 70, ya observó que la capacidad elevada para producir IgE podría ser resultado de una supresión disminuida. Veamos el papel que desempeñan las citocinas y las interacciones celulares en la regulación de la síntesis de IgE, según los conocimientos actuales realizados en su mayoría "in vitro".

A- Papel de las citocinas en la regulación de la IgE

Avances recientes en el conocimiento de la actividad de ciertas linfocinas sobre la regulación de la IgE, pueden aclarar el aumento de su producción en la atopia. En los últimos años, determinadas linfocinas, no ligadoras de IgE, como la IL-4 (interleukina 4) y el IFN-gamma (interferón gamma), parecen haberse convertido en los factores estimuladores y supresores dominantes de la síntesis de IgE, respectivamente (2) (3). Estas linfocinas son productos de los linfocitos T.

En cultivos celulares "in vitro" se ha visto que la IL-4 es un promotor muy eficaz de la síntesis de IgE por linfocitos B de sangre periférica, aún en individuos no atópicos, con un aumento de la misma dosis dependiente, aunque con dosis variable para cada donante (4) (3) (5). La capacidad de los linfocitos humanos para sintetizar IgE "in vitro" depende fuertemente de la cantidad respectiva de IL-4 e IFN-gamma que está presente durante los tres primeros días de cultivo (6).

De particular interés es el hallazgo de Finkelman y col. (7), quienes empleando anticuerpos monoclonales anti-IL-4, consiguieron suprimir, mediante su inyección, la síntesis de IgE en ratones parasitados, por lo que la IL-4 parece jugar también el mismo papel "in vivo".

Hoy se conoce que la producción de IgE IL-4 inducida está regulada de forma positiva y negativa por diferentes vías, que resumimos a continuación: (tabla I)

- El IFN-gamma inhibe completamente esa síntesis (8).

- El IFN-alfa y la PGE2 (prostaglandina E 2) en menor medida tienen el mismo efecto (9). La acción del IFN-gamma y alfa aparece no sólo a nivel de la activación precoz inducida por IL-4 sino que también bloquean la síntesis de IgE en las células B en un estado donde la IL-4 no es activa (6).

- La IL-4 también induce un aumento débil en la producción de IgG (menor que la IgE), y particularmente de la IgG4 (10), hecho que es inhibido por el IFN-gamma (6).

- Las IL-2, 5 y 6 potencian la síntesis de IgE IL-4 inducida pero en ausencia de esta última carecen de efecto (5). Es decir, potencian la vía regulatoria por la que la IL-4 induce la síntesis de IgE. Anticuerpos anti IL-6 inhiben fuertemente la síntesis de IgE inducida por IL-4. La IL-2 no es específica para la IgE pues también aumenta la IgG, A y M, mientras que la IL-6 no tiene efecto sobre esos isotipos (6). La IL-5 aumenta la síntesis de IgA en ausencia de IL-4 pero con esta se produce un bloqueo en su producción (5).

- El factor soluble del receptor de baja afinidad para la IgE (FceRII soluble o CD23s) aumenta la síntesis de IgE inducida por IL-4, aunque es inefectivo sólo (3). Es un efecto isotipo específico. A su vez, y como se verá más adelante, la IL-4 actúa sinérgicamente en la síntesis de CD23 y CD23s (11).

- Anticuerpos anti-CD23 bloquean la síntesis de IgE inducida por IL-4 (quizás estabilizando el receptor FceRII, al igual que hace la IgE, e impidiendo la liberación de CD23s (6) (12). Esta acción sólo la desarrollan algunos anticuerpos monoclonales (mab) de modo que parece un efecto epítipo-restringido (12).

- Anticuerpos anti-IL-4 suprimen la síntesis de IgE pero no afectan o sólo lo hacen débilmente a otras clases de Ig (5).

- Esta síntesis se inhibe con mab contra moléculas de adhesión como CD2 o CD4 pero no para CD8 (13).

- También se inhibe con mab contra el TCR/CD3 de las células T y el HLA (antígeno mayor de histocompatibilidad) clase II de los linfocitos B (13).

Tabla I

SINTESIS DE IgE INDUCIDA POR IL-4

FACTORES MODULADORES	
Activadores	Inhibidores
IL-4	IFN-gamma
IL-2	IFN-alfa
IL-5	PGE2
IL-6	anti-CD23
CD23s	anti-IL-4
	anti-CD2
	anti-CD4
	anti-TCR/CD3
	anti-HLA

Estos datos indican que la síntesis de IgE humana puede estar regulada por una cascada de citoquinas y entre estas podría considerarse a la fracción soluble del CD23. Se sabe, por otro lado, que la IL-4 puede contribuir a la activación de las células B, es necesaria para la inducción de receptores de IL-6 y además, parece actuar como una señal precoz para el cambio de clase a IgE, posiblemente facilitando la accesibilidad de la región épsilon a una recombinasa común (13). La IL-6 podría proveer una señal más tardía para la síntesis de IgE y amplificar la diferenciación terminal a células altamente secretoras (14). La

IL-5 promueve el crecimiento y diferenciación de las células B. En humanos no se tienen datos fiables sobre si todas estas linfoquinas pueden elaborarse por las mismas clonas de células T (15).

B- Interacción célula-célula en la regulación de la IgE

En la regulación de la IgE, además de la presencia de determinadas citocinas, es necesario un particular contacto celular y, de esta manera, Vercelli y col. (16) han demostrado que la inducción de síntesis de IgE por IL-4 recombinante es estrictamente dependiente de células T, es óptima en la presencia de monocitos y amplificada por IL-5 e IL-6.

Aunque, como se ha comentado, son necesarias señales adicionales a la IL-4 para la síntesis de IgE, no obstante, esos factores solubles de los linfocitos T y monocitos (citocinas), aún combinadas de forma óptima, no reemplazan a los linfocitos T y monocitos en la síntesis de IgE inducida por IL-4. Esto sugiere que es necesaria una interacción célula a célula.

La síntesis de IgE precisa la interacción entre el complejo TCR/CD3 (receptor para el antígeno de la superficie del linfocito/antígeno de diferenciación CD3) de las células T y el HLA de clase II de las células B, así como la contribución de las moléculas de adhesión -la síntesis se inhibe con mab contra

moléculas de adhesión- (17) (18); la interacción celular, con la secreción de IL-4 puede superar el efecto inhibitorio del IFN-gamma (17). Con todo el el linfocito B pasa a una fase de actividad celular (G0 — G1). Esta fase no se inicia con factores solubles de las células T sino por la unión de ambas membranas (las membranas solas purificadas de las células Th son capaces de iniciarlas). Posteriormente la IL-4 promueve la transición celular de G1 — S.

Quizás exista una transducción de una señal bioquímica a raíz de esa interacción física o bien se liberen en la interfase célula-célula linfocinas activadas localmente desde las células T a las B. Ambas posibilidades no son excluyentes. La observación de que mab anti-HLA clase II, pero no anti clase I inhiben la síntesis de IgE, es concordante con el hallazgo de que mab anti-CD4, pero no anti-CD8, también bloquean la producción de IgE, e indica que las células T helper CD4+ están implicadas en el reconocimiento de las células B.

Tomando juntos los resultados se sugiere que al menos dos señales están envueltas en la producción de IgE: una señal deriva del reconocimiento por las células T del HLA clase II de las células B; la otra mediante la IL-4 derivada de la célula T. Quizás la íntima interacción de estas células induzca la liberación local de linfocinas como la IL-4, por parte del linfocito T, con acumulación regional de las mismas.

Las dos señales probablemente sean sinérgicas en la activación de la célula B para producir IgE. Es posible que el contacto íntimo entre estas células se siga de la transducción de una señal de activación a través de la molécula de clase II del HLA u otras moléculas accesorias de la membrana de la célula B. La estimulación de las células B por IL-4, las cuales llevan receptores para ésta aún en estado de reposo, aumenta la densidad de HLA clase II de 5 a 10 veces. Un incremento en la densidad de HLA clase II en las células B puede aumentar su capacidad para activar un subgrupo de células T que reconozcan HLA de clase II más péptidos propios o extraños (17). Por tanto, la IL-4 podría por un lado favorecer el reconocimiento T/B, y por otro, dirigir la respuesta B hacia el isotipo IgE, actuando como un factor de cambio de clase (17).

Pène (6) ha observado que las células mononucleares de pacientes atópicos con niveles elevados de IgE producen niveles aberrantes de IL-4 e IFN-gamma pues sintetizan, después de la activación "in vitro" con activadores policlonales (PHA o PMA) niveles más elevados de IL-4 y más bajos de IFN-gamma que las células mononucleares de donantes sanos testados en paralelo. En este sentido, es interesante señalar que se distinguen tres subpoblaciones de linfocitos T CD4 + (Th0, Th1 y Th2) en función del patrón de linfocinas que produzcan. Las células Th0 producen, entre otras, IFN-gamma e IL-4, mientras que las TH1 producen IFN-gamma e IL-2 y las TH2 IL-3, IL-4, IL-5 e IL-6, así como otras

linfocinas. Dado que se cree que las células Th0 son precursoras de las otras dos, es posible que en la atopia hubiera una diferenciación preferencial hacia las Th2, productoras de IL-4 (19) (20). Las células Th1 probablemente están implicadas en la hipersensibilidad retardada y en la síntesis de IgM y algunas subclases de IgG (G2), mientras que las Th2 parecen importantes en la reacción alérgica-like, incluyendo la síntesis y regulación de la respuesta IgE. Más recientemente se ha identificado una citocina producida por Th2 (citokine synthesis inhibitory factor o interleucina 10 : CSIF, IL-10), que inhibe la producción de citocinas de Th1.

Entre las sustancias accesorias a la IL-4 que, como ya se ha comentado, intervienen en la regulación de la IgE, parece cada vez más evidente que se encuentra el FcεRII/CD23, bien en su forma celular bien en su forma soluble (CD23s). A continuación se analizan los conocimientos actuales sobre esta molécula, con particular atención a su actividad funcional.

2- BREVE RESEÑA HISTORICA SOBRE EL FceRII/CD23

La primera demostración de receptores para la IgE en otras células que basófilos y mastocitos fue realizada en 1975 por Lawrence y col. (21) en linfocitos de sangre periférica humanos y por Capron y col. en macrófagos (22).

Aunque las primeras detecciones se realizaron con análisis de rosetas, los anticuerpos monoclonales aumentaron mucho la sensibilidad de detección. Rector y col. fueron los primeros en documentar distintos mab para el FceRII humano (23).

Dos grupos por separado demostraron que el FceRII era idéntico al antígeno de diferenciación de los linfocitos B humanos denominado CD23 (también llamado BLAST-2 o EBVCS -células B transformadas por el virus de Epstein-Barr-) (24) (25). Actualmente, esta molécula está bien definida por el *cluster* de designación CD23. Recordemos brevemente en qué consiste el sistema CD.

Marcadores celulares. Sistema CD

Los linfocitos y otros leucocitos expresan gran número de diferentes moléculas en su superficie. Algunas de estas moléculas aparecen en determinados estadios de la diferenciación o activación celulares durante breves periodos de tiempo, mientras

que otras son características de distintas líneas celulares.

Las moléculas que pueden utilizarse para identificar a las poblaciones celulares reciben el nombre de marcadores, y en muchas de ellas esta identificación puede realizarse mediante anticuerpos monoclonales específicos. En fechas recientes se ha desarrollado una nomenclatura para estas moléculas de la superficie celular, el sistema CD, en el que los marcadores se numeran como CD1, CD2 etc. El término CD (designación de agrupamientos; cluster designation) provino del análisis computadorizado de los anticuerpos monoclonales, contra los antígenos leucocitarios humanos llevado a cabo por diferentes laboratorios de todo el mundo. Un comité internacional determinó los patrones de tinción sobre los leucocitos y los pesos moleculares precipitados por los anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales con características de especificidad similares se agruparon conjuntamente bajo el mismo número CD. Este número se utiliza también hoy para indicar la molécula específica reconocida por un grupo de anticuerpos monoclonales.

Los marcadores se pueden poner de manifiesto por medio de anticuerpos fluorescentes. En este caso, los marcadores de superficie actúan como antígenos. La tecnología de hibridomas para fabricar anticuerpos monoclonales, juntamente con la citometría de flujo (que permite enumerar y separar las células basándose en su tamaño y en la intensidad de la fluorescencia)

han revolucionado los estudios sobre las actividades funcionales de las poblaciones celulares de linfocitos.

3- ESTRUCTURA MOLECULAR DEL FcεRII/CD23

A diferencia de lo que sucede con otros receptores de las inmunoglobulinas (receptores de la porción Fc), donde se incluye la cadena alfa del FcεRII, el FcεRII/CD23 no es un miembro de la denominada familia de supergenes de las inmunoglobulinas, sino que pertenece a una superfamilia primitiva de lectinas que aparece en animales vertebrados e invertebrados (familia de las lectinas animales tipo C) (26). Estas lectinas son proteínas no enzimáticas que se unen selectivamente a estructuras carbohidrato específicas. Otros miembros de esta superfamilia son, por ejemplo, la betagalactosidasa, el receptor de la transferrina, la 2,6 sialotransferasa, algunas cadenas invariantes de la molécula de clase II del HLA, la apoproteína del surfactante pulmonar humano, la molécula de adherencia leucocitaria endotelial, etc.

Una característica de esta familia de moléculas es su orientación inusual cuando aparecen ligadas a la membrana plasmática, en el sentido que el extremo aminoterminal se dirige hacia dentro de la membrana, hacia el citoplasma, mientras que el carboxiterminal lo hace hacia fuera del mismo, haciéndose extracelular (proteína de membrana integral tipo II).

Existen diferencias moleculares importantes entre los receptores de alta y baja afinidad para la IgE. El FcεRI posee cuatro

cadena polipeptídicas, una alfa, una beta y dos gamma; la cadena alfa posee el lugar de unión de la IgE y, como se ha comentado anteriormente, es un miembro de la familia de supergenes de las inmunoglobulinas.

En contraste, el FcεRII se compone de una cadena glicoproteica única con un peso molecular de 45 KDa en SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS). Contiene residuos de ácido siálico, carbohidratos en enlace O-glucosídico y una cadena de carbohidratos en enlace N-glucosídico de tipo complejo en la posición 64 (27). Esta última cadena aumenta la estabilidad del receptor (28). Las figuras 1 y 2, que se exponen a continuación, representan dos modelos gráficos del CD23.

FIGURA 1

MODELO ESTRUCTURAL DEL CD23

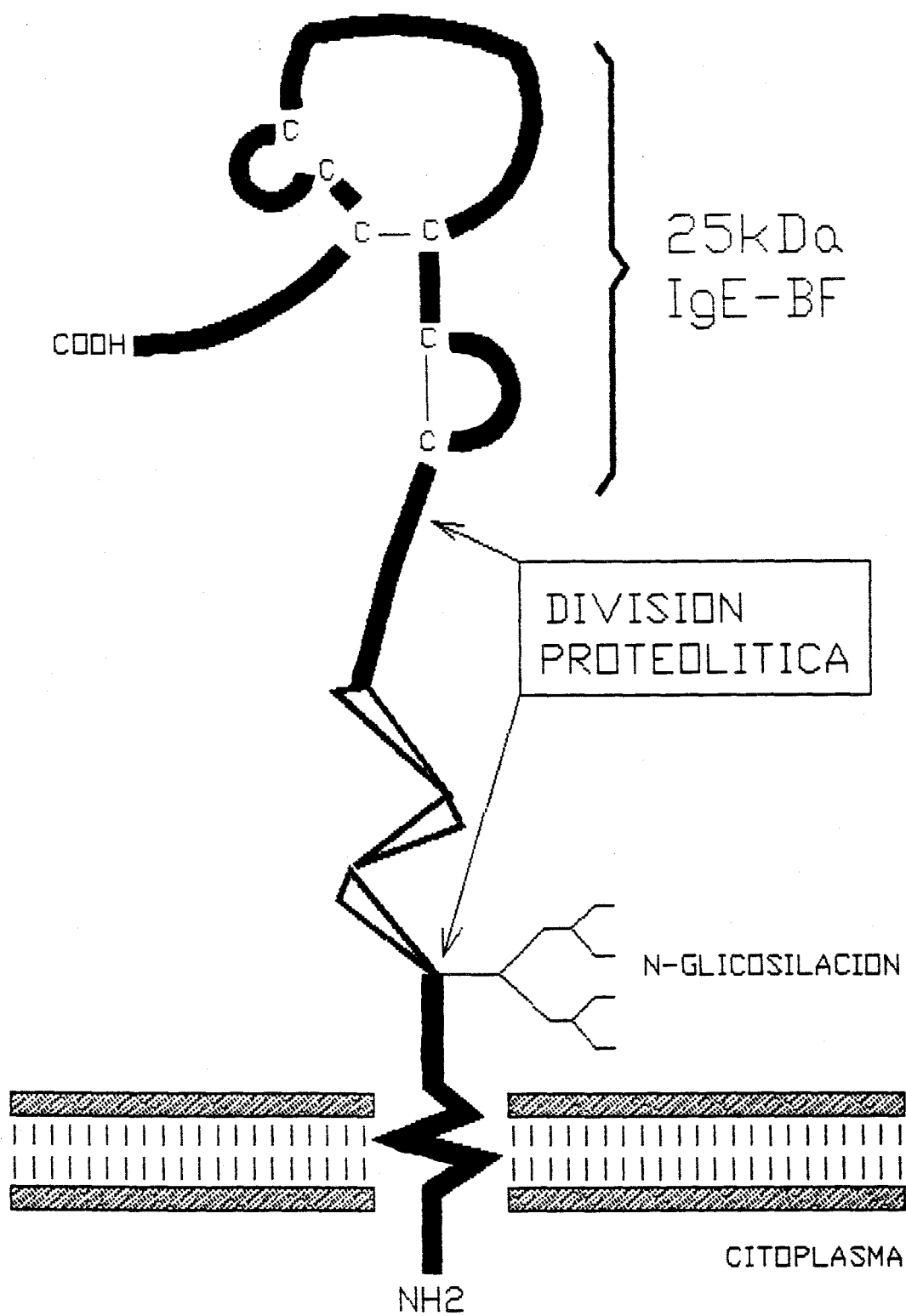
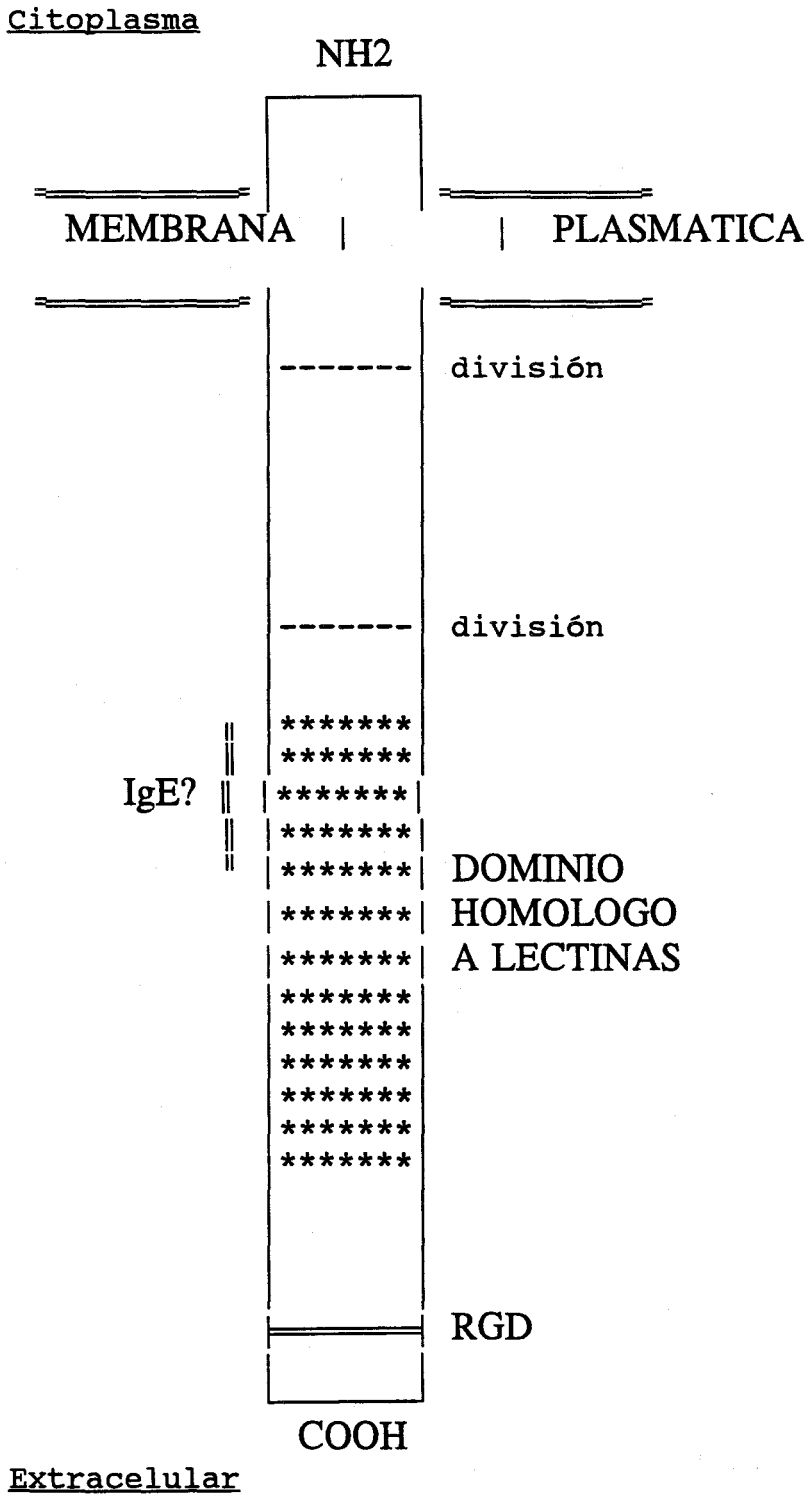


FIGURA 2

MODELO ESTRUCTURAL DEL FcεRII/CD23



La secuencia aminoácida del FcεRII/CD23 se compone de 321 residuos que forman una proteína de 36 KDa, sin homología con la cadena alfa del FcεRI (29) (fig. 3). La secuencia aglicosilada mediante tunicamicina (sustancia que inhibe el acoplamiento de oligosacáridos por un grupo amino a los péptidos), interactúa con la IgE con similar afinidad que el receptor plenamente glicosilado, pero se degrada rápidamente a la forma soluble (28)(27). La porción de esta secuencia comprendida entre los residuos 24 y 44 constituyen una región muy hidrofóbica, típica de un dominio transmembrana. Existen otros dos dominios, uno corto intracitoplásmico, de 23 AA, seguido del comentado dominio transmembrana, y de un tercer dominio, amplio y extracelular, de 277 AA, que integra el extremo carboxiterminal.

Precisamente, el extremo carboxiteminal, es decir, la porción extracelular del receptor, ofrece, de forma intrigante, una configuración reversa del triplete de aminoácidos Arg-Gly-Asp (arginina-glicina-ácido aspártico), secuencia que es frecuente en algunos receptores implicados en las reacciones de adhesión célula-célula (30). Esta configuración hace factible la propiedad de unión a receptores de células adyacentes o incluso a estructuras próximas dentro de la propia membrana celular. Tal interacción podría determinar la estrecha asociación entre la "integrina gpIIb/IIIa" y el CD23 expresado en las plaquetas (31).

Fig. 3 SECUENCIA AMINOACIDA DEL CD23

1 Met Glu Glu Gly Gln Tyr Ser Glu Ile Glu Glu Leu Pro Arg Arg
 20 Arg Cys Cys Arg Arg Gly Thr Gln Ile Val Leu Leu Gly Leu Val
 40 Thr Ala Ala Leu Trp Ala Gly Leu Leu Thr Leu Leu Leu Leu Trp
 50 His Trp Asp Thr Thr Gln Ser Leu Lys Gln Leu Glu Glu Arg Ala
 70 Ala Arg Asn Val Ser Gln Val Ser Lys Asn Leu Glu Ser His His
 80 Gly Asp Gln Met Ala Gln Lys Ser Gln Ser Thr Gln Ile Ser Gln
 100 Glu Leu Glu Glu Leu Arg Ala Gly Gln Gln Arg Leu Lys Ser Gln
 110 Asp Leu Glu Leu Ser Trp Asn Leu Asn Gly Leu Gln Ala Asp Leu
 130 Ser Ser Phe Lys Ser Gln Glu Leu Asn Glu Arg Asn Glu Ala Ser
 140 Asp Leu Leu Glu Arg Leu Arg Glu Glu Val Thr Lys Leu Arg Met
 160 Glu Leu Gln Val Ser Ser Gly Phe Val Cys Asn Thr Cys Pro Glu
 170 Lys Trp Ile Asn Phe Gln Arg Lys Cys Tyr Tyr Phe Gly Lys Gly
 190 Thr Lys Gln Trp Val His Ala Arg Tyr Ala Cys Asp Asp Met Glu
 200 Gly Gln Leu Val Ser Ile His Ser Pro Glu Glu Gln Asp Phe Leu
 220 Thr Lys His Ala Ser His Thr Gly Ser Trp Ile Gly Leu Arg Asn
 230 Leu Asp Leu Lys Gly Glu Phe Ile Trp Val Asp Gly Ser His Val
 250 Asp Tyr Ser Asn Trp Ala Pro Gly Glu Pro Thr Ser Arg Ser Gln
 260 Gly Glu Asp Cys Val Met Met Arg Gly Ser Gly Arg Trp Asn Asp
 280 Ala Phe Cys Asp Arg Lys Leu Gly Ala Trp Val Cys Asp Arg Leu
 290 Ala Thr Cys Thr Pro Pro Ala Ser Glu Gly Ser Ala Glu Ser Met
 310 Gly Pro Asp Ser Arg Pro Asp Pro Asp Gly Arg Leu Pro Thr Pro
 320 Ser Ala Pro Leu His Ser



Variedades moleculares del FcεRII/CD23

Existen dos modalidades de receptor CD23, denominadas FcεRIIa y FcεRIIb, que difieren tan sólo en los primeros seis aminoácidos del extremo aminoterminal de la región citoplásmica, pero sus dominios transmembrana y extracelular son idénticos; por tanto, la diferencia estructural es citoplásmica (32). Mientras que el receptor "tipo b" es común a todas las células que expresan CD23, el receptor "tipo a" sólo es expresado por las células B, y en estas células parece ser que lo hace de forma constitutiva (32). El sistema murino sólo expresa un tipo de receptor, más parecido al tipo a y las únicas células que expresan FcεRII son los linfocitos B.

Estas dos formas ofrecen una evidencia molecular para un pleiotropismo funcional de esta estructura, si bien, realmente no hay datos definitivos que sugieran una diferencia funcional entre los tipos a y b. El tipo b sería el responsable de los efectos IgE mediados y contra las infestaciones parasitarias.

Quizás el FcεRIIb se desarrolle mediante un proceso linfocito T-dependiente (por medio de la IL-4), mientras que el FcεRIIa de las células B sería T-independiente. Sin embargo, un dato en contra de esto son algunos trabajos en los que se ha observado que la IL-4, que como se sabe procede del linfocito T, es capaz de aumentar la expresión del FcεRIIa en los linfocitos B (33).

FceRII/CD23 y HLA

Bonnefoy y col. (34) han demostrado mediante mab que el CD23 está espacialmente relacionado con el HLA DR en la superficie de los linfocitos B, tanto en células estimuladas por el EBV (linea celula RPMI 8866) como en linfocitos normales estimulados por IL-4 recombinante, excluyendo la posibilidad de que estos mab vayan dirigidos contra epítotos comunes de FceRII y HLA DR. Anticuerpos monoclonales anti-HLA DR no inhiben la unión de la IgE al FceRII aunque son capaces de inmunoprecipitar el complejo HLA DR-FceRII, sin que se sepa si estos mab son específicos de la cadena alfa o beta del HLA DR. Una asociación similar se ha encontrado entre otros receptores y el HLA, por ejemplo entre HLA clase I y el receptor de la insulina.

Además se ha relacionado la respuesta inmune a algunos alergenios (ambrosía, lolium) con determinados HLA (HLA DR2, DR 3) (35) y tanto el HLA como el CD23 se inducen por IL-4; por tanto, la expresión del CD23 y el reconocimiento del alergenio mediante IgE unida a la célula asociada con el HLA puede ser esencial para la inducción de las enfermedades alérgicas.

4- INTERACCION IgE-FcεRII/CD23

El FcεRII se une específicamente sólo a la configuración nativa del fragmento Fc de la IgE, por lo que por deficiencia, puede denominarse un receptor Fc, aunque no pertenezca a la familia de supergenes de las inmunoglobulinas.

Se ha calculado una afinidad de unión de la IgE de $10^{6-7} M^{-1}$ (Ka) en linfocitos humanos, en contraste con 10^9 para mastocitos (27). Es decir, la afinidad de la IgE por el FcεRII es unas 100 veces más baja que por el FcεRI. Además, la disociación de la IgE en el FcεRII es muy rápida lo que quizás hace mucho más sugerente una función de transmitir información que de unión al antígeno, aspecto es más característico del FcεRI.

A- Lugar de unión del FcεRII/CD23 a la IgE

Para Delespesse y col. (29) el lugar de unión a la IgE del FcεRII está contenido en la región homóloga a las lectinas. Bettler y col. (36) delimitan, mediante un análisis funcional de mutantes delecionadas de la molécula de FcεRII, el dominio que se une a la IgE en una región de 128 AA (residuos 163-282). La secuencia homóloga entre el FcεRII y las lectinas está confinada en esta región. La región central de homología está distribuida sobre una región de 92 AA que comprenden los residuos 191-282 del FcεRII. La conservación de residuos de cisteína entre FcεRII y

las lectinas sugiere que tienen un plegamiento similar de su dominio homólogo, y los resultados de estos autores indican que el correcto plegamiento es crítico para la función del FcεRII pues la delección de las cisteínas tiene efectos deletéreos en la unión a IgE. Esta región de homología tiene todas las características de las lectinas tipo C, las cuales se sabe que se unen a carbohidratos de una forma dependiente de calcio y tienen conservados puentes disulfuro intramoleculares.

La homología de este receptor con las lectinas le otorga la posibilidad de unirse, de forma inespecífica, a moléculas de carbohidratos apropiadas, circunstancia que puede ser importante para determinadas propiedades del receptor. No obstante, ahora se conoce que, aunque la IgE es rica en carbohidratos, se une al FcεRII independientemente de esta actividad lectina-like o interacciones carbohidrato que puede tener, pues tanto las cadenas epsilon recombinantes no glicosiladas como los péptidos sintéticos de IgE se unen eficientemente al FcεRII (30) (37). Por otro lado, en la molécula de CD23 equivalente del ratón cuando se desprovee de la porción carbohidrato, mediante tunicamicina, la unión a la IgE es mejor que con la molécula glicosilada (38). Es decir, la porción carbohidrato no es necesaria para la unión a la IgE, pero abre la posibilidad a que esa región sea usada para interactuar con otros ligandos.

Esto podría entenderse como una evolución del modelo ancestral

de las lectinas, que se une de forma inespecífica a moléculas de carbohidratos, hacia una estructura que reconoce de forma más específica la IgE (el FcεRII).

Como en otros miembros de la familia de las lectinas, este receptor de membrana da lugar a especies solubles menores por división proteolítica. Una consecuencia mayor de la unión de la IgE al CD23 es el enlentecimiento del turnover (30). Esto sugiere que la IgE se une en, o próximo al lugar de división, aunque esto no ha sido investigado en profundidad.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el FcεRII pueden reconocer distintos epítomos de la molécula; en algún caso puede bloquear la unión de la IgE al receptor (ej. mab 7E4) (39), pero en otros casos no (mab 3-5) (40). El hecho de que una variedad de mab CD23, dirigidos contra epítomos distintos de la molécula, inhiban, en distinto grado, la unión de la IgE al receptor de baja afinidad puede significar que estos mab inducen una alteración conformacional del FcεRII (24).

En la actualidad se está estudiando la presencia de moléculas accesorias del FcεRII que pudieran estar implicadas en la formación de complejos FcεRII-IgE, puesto que se ha visto que la fracción solubilizada de determinadas líneas celulares tienen mayor afinidad por la IgE que otras (41). En este sentido, se han observado anticuerpos monoclonales anti-CD23 que inhiben la unión

de la IgE al FcεRII/CD23 sólo en algunas líneas celulares (42).

B- Lugar de unión de la IgE al FcεRII/CD23

La unión de la IgE al CD23 ha sido localizada en la región CH3 de la molécula, que además debe ser un dominio dimérico, pues una única cadena Ce3 no se une al FcεRII (37). El anticuerpo monoclonal denominado mab 27 (anti-IgE humana) reconoce 10 AA (posiciones 367-376) en el dominio CH3 de la IgE y este mab inhibe fuertemente la interacción IgE-FcεRII (43). Un segundo mab dirigido contra aminoácidos (aa) del dominio CH2 también inhibe la unión de la IgE al receptor, pero se ha visto que esa cadena de aa está tridimensionalmente muy próxima a la que reconoce el mab 27 del CH3 (43).

Nakajima y col. (44) también han mostrado que anticuerpos IgG anti-IgE interfieren con la unión de la IgE al FcεRII de linfocitos B e incluso son capaces de disociar la IgE ya unida al receptor (no hay datos de si estos mab también inhiben la unión al FcεRI). Vercelli y col. (45) encuentran que sólo los fragmentos de IgE recombinante que llevan el dominio Ce4 estaban capacitados para unirse de una forma eficiente (con mayor afinidad) al FcεRII de los linfocitos B, sugiriendo que este dominio es esencial para la unión de la IgE a su receptor.

El lugar de unión de la IgE al FcεRI se sitúa en un espacio

monomérico de 76 aa que se extiende en los dominios Ce2-3 (residuos 301-376) (27). Por tanto, los lugares de interacción de la IgE con el FcεRI y II están próximos pero no son idénticos. Esta proximidad se ha podido comprobar mediante la inhibición de la unión de la IgE al FcεRI con altas concentraciones de FcεRII soluble (46).

A continuación resumimos las propiedades más llamativas de los dos tipos de receptores para la IgE.

TABLA II

PROPIEDADES DE LOS DOS TIPOS DE RECEPTORES PARA LA IgE

	FcεRI	FcεRII
Distribución	Mastocitos Basófilos	Linfocitos T y B Monocito/macrófago Eosinófilos Plaquetas Células NK C. de Langherans
Afinidad	$10^9 M^{-1}$	$10^8 M^{-1}$
Estructura	Tetrámero: 1 alfa: 45 kDa 1 beta: 33 kDa 2 gamma: 9 kDa	Cadena única de 45 kDa
Antigenicidad	Común a todos los tipos celulares	Común a todos los tipos celulares
Activación celular mediante	Agregados/ Complejos de IgE	Agregados/ Complejos de IgE
Consecuencia de la activación	Liberación de mediadores	Secreción de media- dores inflamatorios Regulación de IgE

5- EL FceRII/CD23 SOLUBLE Y SU ESTRUCTURA MOLECULAR

La secuencia de los primeros 20 aa aminoterminales de los CD23 solubles coincide perfectamente con un espacio de la secuencia del FceRII, comenzando por la posición 148-150 (26). De esto se deduce que los CD23 solubles son fragmentos proteolíticos del receptor de la membrana plasmática. Contienen residuos de ácido siálico y enlaces O-glicosilados pero no N-glicosilados.

Las células primero liberan al medio fragmentos de 37 kda que tras sucesivas transformaciones acaban en fragmentos más estables de 25 y 12-14 kda. El proceso ocurre desde el aminoterminal, de modo que el fragmento retiene el extremo carboxiterminal. La división, que tiene un carácter autoproteolítico (29), ocurre en la superficie celular, y origina la formación de distintos fragmentos solubles con pesos moleculares sucesivos de 37, 33, 25-27 y 12-14 Kda. Este último puede antagonizar la división inicial (30). Los de 37 y 33 Kda son fragmentos inestables, de vida corta, con capacidad proteolítica sobre sí mismos (autoproteolítica), sobre fragmentos similares y sobre los receptores FceRII originando porciones más estables de 25 y 14 Kda (47). El fragmento de 25 kda no parece tener esa actividad proteolítica (48).

Queda la duda de si el receptor o sus fragmentos pueden tener también efecto proteolítico sobre otros sistemas biológicos. En

este sentido, se han observado algunos antígenos de diferenciación que tienen actividad proteasa: CD10 (o CALLA), CD13 (aminopeptidasa N) y CD26 (dipeptidil peptidasa IV) (48).

Sólo han mostrado propiedad de ligar IgE los fragmentos de 37, 33 y 25 Kda (29).

Lee y col. (50) han demostrado en linfocitos B una vía intracelular para la formación de fragmentos solubles del FcεRII, que muy probablemente procedan de la división de algún receptor FcεRII nuevamente sintetizado antes de que se exprese en la superficie, y no como síntesis de novo propiamente del fragmento, al encontrarse sólo una banda de RNAm para el FcεRII. Este producto intracelular es eventualmente secretado al medio para contribuir al FcεRII soluble y se ha demostrado que es idéntico al FcεRII sérico previamente descrito. El mecanismo que conduce a la división intracelular del FcεRII no está claro. La división ocurre en un lugar arginina-metionina por lo que podría resultar de una proteinasa serina. Es de interés, el conocimiento de que una familia de proteinasas serina arginina-específicas están envueltas en el procesamiento de algunos factores de crecimiento (ej. factor de crecimiento epidérmico).

El dominio homólogo a las lectinas animales se encuentra enteramente dentro del fragmento soluble de 25 Kda, en su porción media.

CD23 soluble y otros factores que se unen a la IgE

Se han observado los mismos determinantes antigénicos en los IgE-BFs (factores ligadores de la IgE) derivados de células B, T y macrófagos (51) (52) (53).

La producción "in vitro" de IgE-BF fue documentada primero por Isizaka y Sanberg (1981) quienes mostraron que los linfocitos estimulados por antígenos solubles o células alogénicas, liberaban IgE-BFs bajo incubación con IgE.

Procedente de las células T se han observado factores solubles ligadores de IgE idénticos al CD23s (54) y otros factores que también ligan la IgE pero que probablemente no guardan ninguna relación con el FcεRII. Estos últimos sólo se segregan por los linfocitos T CD4 (FcεR+, FcγR+ o ambos) (55) y su producción puede estar inducida por la IgE y sustancias interferon-like (6) (56). En el modelo animal (roedores) se ha clonado el gen que codifica estos factores, no así en el humano (29). El factor inicialmente liberado es una proteína segregada, de 60 kda, y no una proteína de membrana como el CD23s; posteriormente se excinde en moléculas de 30 y 15 Kda (también en humanos) (55). En líneas celulares B también se han observado IgE-BFs de peso molecular similar a estos factores T derivados (52) (53).

Estas sustancias, al menos en humanos, no parece que guarden

relación con el CD23, como ya se ha comentado de 45 Kda, y las mismas cadenas peptídicas dependiendo de que se encuentren N-glucosiladas o no parece que tienen una acción potenciadora o supresora, respectivamente, sobre la síntesis de IgE por parte de las células B (29). En este caso, las moléculas de carbohidratos juegan un papel esencial en la acción biológica (55). Las mismas células son capaces de formar el factor potenciador y supresor y la actividad depende del proceso de glicosilación de la misma molécula precursora (57). Existen linfocinas, también producidas por los linfocitos T helper, que regulan ese proceso de glicosilación denominadas GIF (factor inhibidor de la glicosilación) y GEF (factor aumentador de la glicosilación) (55).

Se ignora el papel que puedan tener estas linfocinas en la glicosilación del FcεRII; recordemos que la glicosilación de este receptor aumenta su estabilidad, disminuyendo la formación de CD23s.

6- GEN DEL FcεRII/CD23

Existen evidencias que indican que los receptores de baja afinidad, descritos en gran variedad de células hematopoyéticas, son muy similares; es probable que representen productos del mismo gen, independiente de que pueda haber modificaciones postranscripcionales de las proteínas del receptor (42).

La estructura molecular del gen que codifica el componente principal del FcεRII ha sido descrita independientemente por tres grupos (26) (58) (59).

Los genes humanos del CD23 comprenden aproximadamente 13 kilobases (kb) y se forman de 11 exones. El CD23s de 25 Kda está codificado por los exones, estrechamente unidos, del 9 al 11, los cuales están bien separados, mediante un intrón de 5 kilobases, del exon 8. Esta marcada división de los genes refleja la estructura dimórfica de sus productos proteicos (FcεRII y factores solubles) (29).

El FcεRII/CD23 no muestra secuencia homóloga con ninguno de los tres componentes clonados del FcεRI.

La homología entre CD23 y lectinas también es obvia a nivel de la estructura génica de forma que sugiere un gen ancestral común (60).

Las dos modalidades de receptores CD23, el FcεRII a y b, están codificados por el mismo gen, el cual, puede activarse por dos promotores distintos, resultando en sitios diferentes de inicio de la transcripción, lo que conduce a secuencias distintas RNA mensajero (60) (33). El punto diferente está localizado entre los exones 2 y 3 (un exon específico del tipo b localizado a ese nivel), con una región de codificación común que comprende los exones 3 al 11.

7- CELULAS QUE EXPRESAN CD23. ALGUNOS ASPECTOS RELACIONADOS CON LA ATOPIA

La molécula de CD23 se ha observado en una amplia variedad de células hematopoyéticas como linfocitos B (61) (30) (47) (62), linfocitos T (63), eosinófilos (64) (65), plaquetas (66), monocito-macrófagos (67) y células NK (68), así como en células de Langerhans epidérmicas (69) y células dendríticas foliculares (30) (47). Todas las células que llevan FcεRII son fuente potencial de CD23 soluble.

Las células B pueden expresar FcεRIIa y FcεRIIb, mientras que el resto de células sólo expresan este último. El FcεRIIa aparece en las células B no estimuladas, mientras que el "tipo b" se expresa cuando esas células se estimulan; en general esta forma está dramáticamente sobrerregulada por la IL-4 desde esencialmente indetectable hasta altos niveles (47).

El hecho de que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el FcεRII reaccionen en todas estas células confirma los estudios bioquímicos de que la estructura de este receptor es la misma o similar para los diferentes tipos de células (51).

En los linfocitos B la expresión del FcεRII está restringida a células que coexpresan las Igs de superficie M y D (sIgM, sIgD); es decir, a las células bien diferenciadas (maduras). Por

ello, actualmente, se le ha considerado un antígeno de diferenciación celular (más que de activación) (44), transitoriamente expresado en las células B maduras (también inducido por mitógenos). No obstante, este principio no es absoluto, y se han observado células procedentes de LLC B (leucemia linfocítica crónica de células B) sIgG+ que expresan el CD23 (70).

La expresión aparece tanto en células B potencialmente productoras de IgE como de otras Igs (71). Esta expresión se pierde en las células plasmáticas; en realidad se pierde cuando el linfocito realiza el cambio de clase de Ig, aunque sea al isotipo épsilon. Se ha observado tanto en sangre periférica como en otros tejidos linfoides (ej. amigdalas, bazo) (51) (24).

Resumiendo, la expresión en los linfocitos B está correlacionada estrictamente con el estado de diferenciación (maduración) de la célula (40) (72), y en este sentido se distinguen los siguientes estados de estas células con respecto al FcεRII/CD23:

a- Las células B de la médula ósea con IgM e IgD de superficie no expresan CD23, aunque su expresión puede inducirse (con forbol ester o anti-IgM).

b- Esas mismas células circulantes sí lo expresan. La mayoría de estas células presentan este receptor.

c- Las células B circulantes, sin IgD de superficie, las cuales están realizando el cambio de clase a célula productora de IgG, A ó E no expresan ni puede inducirse en ellas la

expresión del FcεRII; la pérdida del receptor es irreversible, y no parece deberse a una delección del gen.

Se ha observado la expresión de CD23 tanto en linfocitos B CD5+ como CD5- (73). Este marcador, sirve para identificar una subclase de éstas células que tienden a formar autoanticuerpos.

En lo que se refiere a la intensidad de expresión de la molécula de CD23 en los linfocitos B, existen algunas discrepancias cuando revisamos la literatura médica, tanto en individuos sanos como atópicos.

Para Delespesse y col. (74) (47) el 40-70% de los linfocitos B de sangre periférica de personas sanas son FcεRII positivos, o el 8% de las células mononucleares de sangre periférica (el 30% de los linfocitos de amígdalas) y encuentran que en los individuos alérgicos aumenta la densidad de receptores en cada célula aunque no el número de células que lo expresan. Kikutani y col. (40) (75) encuentran aproximadamente un 50% de células B FcεRII+ en amígdalas (en pacientes con amigdalitis crónica), 80% en sangre periférica y 3% en médula ósea de donantes sanos. Sin embargo, en un trabajo reciente, Matsumoto y col. (63) sólo encuentran en sanos un 4.7 +/- 3.4 % de linfocitos B que son CD23 positivos; este porcentaje en niños asmáticos alérgicos a ácaros con IgE mayor de 2000 Ku/ml aumenta a 19.2 +/- 7.8. Bonnefoy y col. (24) documentan menos del 15% de linfocitos B CD23+ en

sanos, 1-4% de células mononucleares de sangre periférica, 2-9% de amígdalas y 4-5% de bazo.

Las diferencias entre estos autores pueden deberse a las distintas sensibilidades del ensayo y de los anticuerpos monoclonales; el anticuerpo específico puede tener un patrón distinto de unión, además de reconocer epítomos diferentes de la molécula. Se han descrito incluso diferencias en la expresión del CD23 en relación al gradiente de centrifugación usado en el procesamiento de la muestra (39).

Respecto a los linfocitos T, existen varios estudios que apoyan, no sólo la expresión de CD23 en sujetos sanos, sino un incremento de las células que lo expresan en individuos "altamente" atópicos aunque con menor intensidad que en las células B (63) (76) (77) (39).

Por otra parte, también se ha observado un RNAM del FcεRII similar al encontrado en las células B (78). Esto es de particular interés pues estas células pueden estimular o suprimir la síntesis de IgE.

Inicialmente, algunos investigadores no pudieron demostrar FcεRII/CD23 en los linfocitos T, probablemente en relación con la escasez de expresión del receptor en esas células (79) y la utilización de técnica de rosetas, menos sensible que los mab.

Matsumoto y col. (63) observaron en linfocitos de sangre periférica una expresión del CD23 en un 1.6 ± 1.4 de los linfocitos T totales y una correlación entre el porcentaje de células T CD23+ y la cantidad de Ig-BFs liberados al cultivo. Prinz y col. (78) han encontrado un incremento en la expresión del CD23 en linfocitos T helper tras la estimulación con antígeno en pacientes alérgicos a veneno de abeja y a mosquito, alcanzando una expresión de 7.9 ± 2.2 respecto a linfocitos totales. Sólo observaron CD23 en la población CD4+CD29+ pero no en la población CD2+CD8+ ni CD2+CD45+. Precisamente las células CD4+CD29+ influyen positivamente sobre la respuesta inmunitaria de las células T y B, es decir, tienen una función cooperadora. Sin embargo, las células que inducen funciones supresoras/citotóxicas en las células CD8+, esto es, con una función inductora de la supresión, expresan CD45 (80). En este mismo estudio, otras sustancias antigénicas pero no inductoras de IgE con el PPD o el toxoide tetánico no indujeron CD23 de forma importante. Estos linfocitos T podrían representar la fuente natural del CD23s.

Kawabe y col. (81) encuentran inducción del FcεRII/CD23 en linfocitos de sangre periférica de donantes sanos, tanto CD4 como CD8, y sin una diferencia significativa entre ambos.

Para algunos autores no está claro si el FcεRII que expresan estas células es de producción propia o resultado de la absorción de fragmentos solubles (27). Sin embargo, no hay evidencia de

lugares de unión para los IgE-BFs en las células T y además se ha demostrado RNAm para el FcεRII/CD23 en las células T normales (81).

En algunas clonas celulares de células T (procedentes algunas de ellas de síndrome hiperIgE o de infestación por parásitos), alteradas por el HTLV-1 (virus de la leucemia, un retrovirus RNA), se ha observado la expresión del FcεRII y de IgE-BFs, idénticos a los de origen de las células B (82) (83) (84). El mecanismo responsable de la mayor expresión en estas células puede ser el mismo de la expresión del receptor de la IL-2 o HLA clase II.

También se ha observado un incremento en la expresión de CD23 en monocitos de pacientes alérgicos (62) y los macrófagos fueron la primera célula aparte de los linfocitos B donde se demostró el FcεRII (27). Aunque en los monocitos en reposo no se expresa, su expresión (del FcεRIIb) puede ser inducida por IL-4 (85) (32). En pacientes con alveolitis alérgica extrínseca se ha observado que más de un 60% de los macrófagos alveolares tienen el CD23, en contraste con su mínima o nula expresión en controles sanos (86). Se plantea la participación del receptor en la fisiopatología de esta enfermedad.

En los eosinófilos se ha estimado que el número de receptores FcεRII es de aproximadamente 10^5 por célula y con una estructura

común al CD23 de los linfocitos B (65). Esta expresión ocurre en un 40-50% de estas células con lo que parece excluirse la idea de que estos receptores aparecen asociados al receptor CR3 del complemento, el cual se expresa en la población entera de los eosinófilos. Esa variación podría estar relacionada con el estado de activación de la célula (aparece sólo en los eosinófilos hipodensos, que son los activados). No existen datos sobre la expresión del receptor en estas células en la atopia.

En las células de Langerhans epidérmicas sólo se ha encontrado FcεRII de forma espontánea en las células que proceden de pacientes con dermatitis atópica, pero no en atópicos sin dermatitis ni en controles sanos (69) (87) (88) que en estos puede inducirse mediante IL-4 o IFN-gamma a través de la síntesis de novo del receptor (con un efecto sinérgico entre ambas citoquinas), pero no con IL-2 o PHA (69). La expresión alcanza hasta el 50% de las células. Parece que la presencia del FcεRII en las células de Langerhans no es un fenómeno relacionado con la atopia sino más bien con el proceso eczematoso pues la expresión en piel sana es nula o mucho menor que en el tejido afectado (69).



8- REGULACION DE LA PRODUCCION DE CD23/CD23 SOLUBLE

El nivel del CD23 soluble está determinado por varios factores:

1- El pool de células que llevan FcεRII y la densidad de estos en la membrana plasmática. El CD23 soluble, al constituirse por fragmentos proteolíticos del FcεRII/CD23, se verá influenciado por todas aquellas sustancias que regulen la expresión de este receptor en las células.

2- La razón de división del FcεRII en IgE-BFs.

3- El aclaramiento de los IgE-BFs en el suero.

1- A) *Pool de células FcεRII/CD23+:*

Existen varios trabajos que han documentado en sujetos alérgicos, en enfermedades parasitarias, así como en el síndrome de hiperIgE un aumento del número de células que llevan FcεRII/CD23 y/o de la densidad de estos receptores (47) (63) (89) (62).

Respecto a la expresión de los IgE-BF en atópicos y en enfermedades parasitarias algunos autores como Yanagihara y col. (50) también han encontrado niveles aumentados de estos factores

en suero respecto a controles sanos, tanto en niños como en adultos, y aunque encuentran una relación significativa con la IgE, esta es muy débil como para proveer un buen argumento a favor de una relación causal entre la producción de IgE y de IgE-BFs.

Spiegelberg y col. (61) han documentado que la inyección de IgE humana a monos no aumenta la proporción de células CD23+ en su sangre.

En algunos trabajos (90) (91) se ha observado una variación edad-dependiente de los niveles de CD23s tanto en alérgicos como sanos con una correlación con el número de linfocitos totales CD23+ por lo que en ambos casos esa variación depende del incremento fisiológico del número de linfocitos durante la infancia. Esto sugiere que el CD23s depende más de los linfocitos que de otras células CD23+ pues en estas no existen esos cambios fisiológicos del número absoluto durante la infancia.

B) Regulación del FcεRII/CD23 por citocinas y otros factores:

La regulación de la expresión del FcεRII/CD23 es variable dependiendo del tipo celular o el estado de diferenciación.

Hasta la fecha, la única citoquina conocida que induce, de forma clara y dosis dependiente, la expresión de FcεRII/CD23 (puede aumentar esa expresión hasta 50-100 veces, superinducción)

y la producción de IgE-BFs por las células B es la IL-4, lo que se ha observado incluso con IL-4 recombinante, hasta el punto de que es la modificación fenotípica más llamativa mediada por la IL-4 sobre los linfocitos B (13) (92) y lo puede hacer, aunque con menor intensidad, sobre células B en fase Go del ciclo celular (células no preactivadas) (29) (93) (aunque en estas células disminuye el receptor Fc γ (79)). Esta acción la ejerce más intensamente en linfocitos de individuos atópicos respecto a controles normales, al igual que sucede con mitógenos tipo PHA (fitohemaglutinina) o Con A (concanavalina A) (94) (4) (95).

Un efecto similar se ha observado sobre los macrófagos/monocitos (96) (85) (97), células T (81) y células de Langerhans (47). La regulación de la expresión de Fc ϵ R2 en eosinófilos aún no ha sido bien explorada, aunque también se estimula por la IL-4 (32) (97). Es probable, por tanto, que la expresión del receptor en estas células esté regulada por los linfocitos T a través de la IL-4, y de esta forma se aumente la funcionalidad del eosinófilo en lo que se refiere al CD23 (respuestas IgE mediadas) (32).

También se ha observado un efecto favorecedor de la expresión del Fc ϵ R2 en linfocitos periféricos y de tejido amigdalario (linfocitos B y en menor medida T) y CD23s por parte del TNF α (factor de necrosis tumoral alfa) y de la IL-2 (70) (95), aunque

no de forma dosis dependiente para algunos (94) (81), aunque sí para otros en el caso de la IL-2 (82). No obstante, la expresión de CD23s inducida por la IL-2 es claramente menor que la provocada por la IL-4 (lo hace de forma paralela a la síntesis de IgE), y no todos los autores la han podido demostrar (98) (93). Para algunos (70) esa regulación de la IL-2 requiere una activación previa de la célula B (con anti- μ), y sólo se ve después de 72 horas de cultivo, y en relación directa con la capacidad de proliferación con la IL-2, es decir, sólo lo expresaban las células que proliferaban (70). Esta acción es sólo inhibida parcialmente por el INF-gamma. Se ha sugerido que la IL-2 tendría sólo acción sobre el receptor "tipo a" (99).

La IL-5 aumenta en linfocitos humanos la expresión de CD23 y CD23s en sinergia con la IL-4, mientras que sólo es ineficaz (7). Otras citokinas no parecen haber mostrado sinergia. La IL-1 no ha mostrado acción inductora ni inhibidora del receptor (93). El BCGF (factor de crecimiento de las células B) no tiene acción en la regulación del CD23 (70).

El PAF (factor de activación plaquetario) induce en eosinófilos (línea EoL3) aumento de CD23 (97) y el LTB4 (leucotrieno B4) potencia la acción de la IL-4 en la expresión de este receptor (y la diferenciación de estas células) en los linfocitos B pero no tiene efecto por sí solo (100). Estas acciones podrían generar un círculo vicioso en el foco inflamatorio.

Por el contrario, han mostrado una acción inhibitoria de la expresión del CD23 en linfocitos B y T el IFN-gamma (95), IFN-alfa y la PGE2, tanto la inducida por IL-4 como la expresión espontánea del receptor (93) (8) (9). Esta acción la ejercen sin inhibir la unión de la IL-4 a su receptor (101). Curiosamente estos factores también inhiben la síntesis de IgE. El IFN-alfa tiene la misma acción inhibitoria sobre los monocitos.

Se ha demostrado que la IL-4 y el IFN-gamma regulan de forma diferente el nivel de RNAm del FcεRII (70), es decir, su actuación es a nivel transcripcional.

La acción inhibitoria del IFN-gamma no se manifiesta en células de Langerhans (69) (102), monocitos/macrófagos (3) (85) y plaquetas, e incluso en estas células parece que favorece la sobreexpresión del FcεRII posiblemente mediante la inducción de receptores nuevamente sintetizados (42). Parece que el efecto inhibitorio del IFN-gamma es específico de linfocitos e IL-4 (97), al contrario que los glucocorticoides que inhiben el CD23 en varias líneas celulares (97).

La forma de actuar de las distintas citoquinas es desconocida y podrían usar diferentes vías enzimáticas para expresar el CD23 así como para liberar el CD23s (94) (99).

Lectinas, como FHA y ConA, y forbol ésteres (estos últimos

dismunuyen la expresión de receptor de alta afinidad) también aumentan la expresión del CD23 en linfocitos de sangre periférica (T y B) así como del CD23s, con mayor intensidad en atópicos, sugiriendo una reactividad diferencial en las células de atópicos hacia los mitógenos (79) (53) (95). Por el contrario la dexametasona muestra una disminución de la expresión del receptor, en varias líneas celulares (53) (103) (97). Spiegelberg y col. (61) encontraron en los pacientes con dermatitis atópica severa (tres pacientes) tratados con corticoides por vía sistémica menor expresión del FcεRII en linfocitos totales.

Pfeil y col. (11) han observado aumento de la expresión de CD23 y de CD23s tras la estimulación de los linfocitos de sangre periférica con Dermatofagoides Pteronyssinus en pacientes alérgicos, lo que sugiere un papel del FcεRII en enfermedades alérgicas.

Según Armitage y Goff (104), el incremento de la expresión del CD23 en los linfocitos por los distintos estímulos ocurre en células que ya expresan este receptor aunque sea de forma débil.

En la tabla III resumimos la acción de algunas citocinas y otros factores en la regulación del CD23.

Tabla III

REGULACION DEL CD23 POR CITOCINAS Y OTROS AGENTES

	B	T	M/M	Eos.	Lang.	Plaq
IL-4	+	+	+	+	+	NE
IL-2	+	+				
IL-5	+	+				
TNF- α	+	+				
IL-1	NE	NE				
BCGF	NE	NE				
PAF				+		
LTB4	+					
IFN- γ	-	-	+		+	+
IFN- α	-	-	-			
PGE2	-	-				
Ag.	+	+	+			
Cort.	-	-	-			

B=linfocitos B; T=linfocitos T; M/M=monocito/macrófago
 Eos.=eosinófilos; Lang.=células de Langerhans;
 Plaq.=plaquetas; Ag.=antígeno; Cort.=corticoides
 NE=sin efecto; +=aumento de expresión; -=inhibición

C) Regulación del FcεRII/CD23 e interacción celular:

Estudios de Crow y col. (105) han demostrado la necesidad de una interacción física entre los linfocitos T helper y los B para la expresión del CD23 en estos últimos cuando los linfocitos T se activan con un anticuerpo monoclonal anti-CD3, y sin menospreciar la importancia y también necesidad de las linfoquinas en este sistema. De hecho, el CD23 en los linfocitos está espacialmente relacionado con las moléculas de clase II del HLA y ambas estructuras se regulan de forma simultánea con la IL-4 y el IFN-gamma, aumentándolas y disminuyéndolas, respectivamente.

Se postula que la regulación del CD23 en los linfocitos B sería mediada por un contacto célula-célula y/o citocinas, como la IL-4 que podría ser acumulada en altas concentraciones a nivel local en la interacción célula-célula (72).

Delespesse y col. (51) también han observado la necesidad de factores solubles procedentes de células T activadas para la producción de IgE-BFs por linfocitos B y monocitos.

De especial interés es el trabajo de Kawabe y col. (81) quienes observan que la expresión (con PHA) del FcεRII/CD23 en las células T está suprimida marcadamente mediante la adición de anti-CD23, mientras que las células B no estaban afectadas por este mab, lo que sugiere la implicación de células CD23+ no T o

de IgE-BFs en la inducción de células T CD23+. Estos mismos autores demuestran, separando las células B mediante una cámara de difusión del resto de las células mononucleares, que es necesario un contacto célula a célula B/T para la expresión de CD23 en los linfocitos T.

Estos hallazgos indican que el FceRII/CD23 puede estar envuelto en la interacción efectiva T/B durante la síntesis de IgE. Hay que considerar que algunos mab anti-CD23 suprimen la síntesis de IgE (6) (12) (71).

2- Razón de división del FceRII/CD23:

Mediante inhibidores de la síntesis de proteínas no se afecta la cantidad del CD23s del sobrenadante de los cultivos, lo que quiere decir que estos factores solubles están preformados (forman parte del receptor) (51). El receptor de membrana es degradado rápidamente, con una vida media de dos horas, al fragmento de 37-38 Kda, el cual es liberado de la superficie de la célula como un IgE-BF soluble y a su vez digerido en fragmentos menores (38). La división, y en definitiva la degradación, del FceRII de la membrana en IgE-BF está inhibida por la IgE y algunos anti-CD23 (51) (28) (42). Este efecto podría explicar porqué los sujetos con niveles muy altos de IgE, como los infestados por filarias, tienen niveles relativamente bajos, aunque por encima de lo normal, de IgE-BF (90).

Niveles elevados de IgE están asociados con niveles altos de FcεRII en las células B (atópicos, síndrome hiperIgE) (89) (40), y quizás uno de los mecanismos más importantes de esta sobrerregulación sea la protección de la degradación del receptor a sus fragmentos solubles por la propia IgE, ya que no se ha visto este incremento en la expresión del receptor acompañado de mayor síntesis de aa o del nivel de RNAm. Sin embargo, la IgE claramente aumenta la estabilidad del receptor (27). Esto se ha observado en todos los tipos de células que expresan el FcεRII. Una regulación similar se ha observado también con la IgA y la IL-2 con sus receptores respectivos (42).

La razón de división aumenta con el tratamiento de las células con tunicamicina. Esto indica que la cadena N-glucosilada del FcεRII ejerce un efecto estabilizante y por tanto, reduce la producción de IgE-BF.

3- Poco se conoce acerca del aclaramiento de los CD23s del suero salvo que estas moléculas pueden encontrarse en orina (90).

9- FUNCION DEL FcεRII/CD23

La función biológica exacta todavía es desconocida y sujeta a controversias. La mayoría de las funciones que se le han asignado son putativas, observadas "in vitro" y por pocos investigadores (tabla IV). Desde luego, la función más aceptada es la de unirse a la molécula de IgE, pero las peculiaridades de la estructura del CD23 como la secuencia similar a las lectinas o la particular configuración en el extremo extracelular junto con el hecho de que no pertenezca a la familia de supergenes de las inmunoglobulinas crean una base molecular para una variedad de funciones adicionales.

Por otra parte, la molécula de CD23 puede tener una actividad especializada en función de la célula que lo exprese. Así, en los monocitos, plaquetas y eosinófilos la capacidad de unirse a la IgE representa una ruta alternativa para eliminar parásitos, mientras que en las células B humanas parece proveer un feed-back regulador de esa inmunoglobulina.

1- Regulación del crecimiento de las células B:

La expresión del CD23 es un requisito necesario para que las células B sean susceptibles de transformación al crecimiento por el EBV, de modo que las líneas células B EBV-inmortalizadas son CD23 positivas. Las células infectadas por el EBV con ausencia

de CD23 progresan inexorablemente hacia un fenotipo indiferenciado, no divisible (106).

Se ha propuesto que el CD23 es el receptor para LMW-BCGF (factor de crecimiento de las células B de bajo peso molecular) (107). Esta hipótesis está basada en dos observaciones:

- a) algún anticuerpo monoclonal anti-CD23 (MHM6) o sus fragmentos Fab imitan la actividad del LMW-BCGF cuando se añaden a las células B activadas por forbol-ester y,
- b) el mismo anticuerpo inhibe la absorción del LMW-BCGF por las células B activadas (30).

Esta hipótesis hoy se considera incompatible pues el LMW-BCGF recombinante no inhibe la unión de la IgE o del anticuerpo monoclonal anti-CD23 al FcεRII y existen células FcεRII negativas que responden al LMW-BCGF. Además el mecanismo autoproteolítico del FcεRII no se ve afectado por la presencia de LMW-BCGF (29). A pesar de todo, podría representar un receptor para algún factor de crecimiento de las células B aún no identificado (47).

Sin excluir la posibilidad que el FcεRII pueda unirse a otros ligandos (como sugiere su similitud a las lectinas) Delespesse y col. (29) proponen que el FcεRII es primariamente un precursor, de fragmentos solubles, unidos a la membrana, biológicamente activos. Quizás la función reguladora del crecimiento de las células B sea una de las actividades biológicas de los fragmentos

que derivan de este receptor. Como la IgE ha mostrado estabilizar el receptor e inhibir la división, esta Ig podría ejercer algún papel inmunoregulador previniendo la actividad biológica mediada por los fragmentos solubles del FcεRII.

2- Regulación de la activación de células B:

Se ha observado que el CD23 puede jugar un papel importante en la regulación de la activación de las células B sIgM+/sIgD+ que tienen alta densidad del receptor al inhibirse esa acción con agregados de IgE y con mab anti-CD23 (108).

3- Adhesión celular:

El FcεRII/CD23 puede jugar el papel de ser una molécula de adhesión celular, probablemente en virtud de su estructura lectina (las lectinas solubles se piensa que son importantes en regular la migración y adhesión celular (30)). Esto está sostenido por dos observaciones:

a- después de la transferencia con cDNA de FcεRII, distintas líneas celulares T y B crecen en grupo, mientras que las células controles no forman agregados. La tendencia de las células B transformadas por el EBV para formar acúmulos típicos parece deberse a la expresión del CD23 (10);

b- el dominio lectina del FcεRII muestra una homología fuerte con una familia de moléculas de adhesión celular descubierta recientemente, que incluye, entre otras, la molécula de adherencia leucocitaria endotelial (47) (109). Estas moléculas controlan la migración linfocitaria, probablemente a través de eventos de reconocimiento carbohidrato-dependientes.

Ya se ha comentado al hablar de la estructura molecular del FcεRII, que en el extremo carboxiteminal (porción extracelular del receptor) existe una configuración reversa del triplete de aminoácidos Arg-Gly-Asp, peculiaridad que es frecuente en algunos receptores implicados en las reacciones de adhesión célula-célula (30). Esta configuración ofrece también una base molecular que hace factible la propiedad de unión a receptores de células adyacentes o incluso a estructuras próximas dentro de la propia membrana celular.

4- Presentación de antígeno:

Se ha demostrado que las células B pueden funcionar como células presentadoras de antígeno mediante las Igs de superficie antígeno específicas. Pirron y col. (110) han observado que la unión del complejo antígeno-IgE al FcεRII de las células B transformadas por el EBV conduce a un significativo aumento de la presentación de antígeno a las células T autólogas antígeno específicas. Este aumento era inhibido por un mab anti-CD23 que

bloquea la unión de la IgE a su receptor. Según estos autores, los hallazgos quizás vayan en contra de la idea de que la IgE en estos receptores no es internalizada por la célula; en este caso el FcεRII mediaría la internalización del antígeno y su subsecuente procesamiento y presentación a las células T. Esta observación podría ser de especial relevancia para las células dendríticas foliculares. Además, la relación estérica entre el CD23 y HLA DR apoya la posibilidad de que esté envuelto en la presentación de antígeno.

5- Citotoxicidad mediada por IgE y e inflamación:

Es evidente que la función del FcεRII también va a depender de la célula que lo expresa. Así, en monocitos/macrófagos, eosinófilos y plaquetas media la citotoxicidad IgE-dependiente (en realidad citotoxicidad dependiente de anticuerpo) contra los parásitos, como se ha comprobado con la lisis de la larva del *S. mansoni* marcado con Cr51 (31) (111). Se ha conseguido inhibir esta función en los eosinófilos mediante anticuerpos monoclonales dirigidos contra el FcεRII (65).

De forma interesante, el FcεRII actúa en sinergia con el CD11b (el receptor para el C3bi del complemento o CR3) y ambos son necesarios para la lisis del parásito (111) puesto que anticuerpos monoclonales dirigidos contra la cadena alfa del CR3 también anulan la citotoxicidad del eosinófilo mediada por IgE contra

parásitos (65).

También se ha documentado que el FcεRII promueve la fagocitosis por parte de los monocitos de partículas "revestidas" por IgE (por ejemplo, eritrocitos cubiertos de IgE) (112), así como la liberación de mediadores inflamatorios, incluyendo enzimas lisosomales, prostaglandinas, leucotrienos y PAF, por monocitos, macrófagos, eosinófilos (peroxidasa eosinofílica) y plaquetas, siempre que la IgE no esté de forma monomérica sino en forma de agregados (113).

Un hallazgo interesante a este respecto es que en algunas células, como las plaquetas, la activación IgE-mediada origina una señal diferente que la activación por IgG, de modo que, los agregados de IgE causan importante producción de metabolitos del O₂ con poca liberación de leucotrienos, mientras que ocurre a la inversa con los agregados de IgG (114). Esto puede enlazar con que la importancia en la patogénesis de la inflamación alérgica del FcεRII parece estar más bien vinculada con la fase tardía que con la precoz puesto que la IgA e IgG que no inducen reacciones alérgicas inmediatas son más eficientes en los monocitos que la IgE para liberar gránulos con enzimas y generar derivados del ácido araquidónico (10). Además, como los macrófagos y eosinófilos emigran a las áreas de inflamación reaccionan con complejos IgE-antígeno, liberando mediadores de la inflamación y, por tanto, participando en la fase tardía de la reacción alérgica.

Los macrófagos pueden activarse a través de los receptores para la IgE, como se ha mostrado mediante la inducción de la síntesis IL-1 que sigue a la estimulación con IgE (115). Esta característica otorga a estos receptores un papel en las enfermedades atópicas.

Estas funciones están mediadas por el FcεRIIb y se justifican por su afinidad por la IgE (47).

El papel de citotoxicidad dependiente de anticuerpo no se ha podido demostrar para los linfocitos B a través del FcεRII (ni a través del FcγRII); hay que tener en cuenta que los linfocitos B no poseen gránulos citolíticos (116), a diferencia de eosinófilos, monocitos o plaquetas.

6- Respuesta IgE:

A causa de que el FcεRII se expresa más en las células B de individuos altamente atópicos que en no atópicos se ha sugerido una función del receptor en la formación de IgE.

La consecuencia más reconocida de la unión de la IgE al receptor es la estabilización de esta molécula evitando su división, lo que puede proveer un feedback negativo en la producción de la IgE al liberarse menos factores solubles. Por lo tanto, el CD23 funciona como un receptor para la IgE y podría,

al menos en el hombre, estar envuelto en la producción de Ig isotipo dirigida (30). La IgE parece que no es internalizada después de la unión al receptor de las células B y se desconoce si este es capaz de transducir una señal en estas células (29). No obstante, existe un estudio realizado con hibridomas de células B murinas donde se observa el secuestro, internalización y degradación de la IgE por estas células, planteándose la posibilidad de la participación de los linfocitos B en la homeostasis de la IgE (117).

Por otra parte, se ha observado que la unión de complejos inmunes IgE/anti-IgE y de algunos anti-CD23 al FcεRII de células B productoras de IgE suprime la producción de IgE de forma isotipo específica, para lo que se requiere probablemente un entrecruzamiento de los FcεRII (71). A raíz de estos experimentos se ha postulado que "in vivo" la IgE podría unirse a los IgE-BF para formar complejos que entrecruzarían los FcεRII motivando la supresión de la síntesis de IgE. El mecanismo de esta supresión se desconoce, aunque una posibilidad es que el entrecruzamiento de los receptores suponga una internalización de la molécula de FcεRII y prevenga de esta forma la liberación de los factores solubles desde la superficie (27). Los factores solubles, como se comentará más adelante, parecen tener una acción potenciadora de la síntesis de la IgE.

Pène (6) observa que la IL-4, en paralelo a la producción de

IgE, induce la expresión de CD23 en la membrana de las células B. De forma interesante, el IFN-gamma y alfa y la PGE2, los cuales bloquean la síntesis de IgE IL-4 inducida, también bloquean la expresión del CD23 en las células B. En este sistema, la adición de anticuerpos monoclonales anti-CD23 bloquea la síntesis de IgE. Estos resultados sugieren una asociación entre la expresión de CD23 y la producción de IgE IL-4 inducida y apoyan la idea de que la ausencia de CD23 puede contar para la pérdida de producción de IgE.

Pero para comprender bien el papel que puede jugar el CD23 en la regulación de la IgE es imprescindible considerar una panorámica más amplia que incluya sus fragmentos solubles, cuestión que será abordada a continuación.

10- FUNCION DEL CD23 SOLUBLE

De la misma manera que ocurre con el FcεRII las funciones de los fragmentos solubles se han observado "in vitro" y su significado fisiológico permanece desconocido (tabla IV). Se ha documentado un espectro de funciones biológicas que de confirmarse otorgarían al CD23s un lugar entre las interleukinas pleiotrópicas. Debido a la extrema labilidad y complejidad del procesamiento de estos ensayos es necesario tener precaución al interpretar los hallazgos.

1- Regulación del crecimiento de las células B:

A los fragmentos CD23 solubles se les ha asignado una actividad promotora del crecimiento de las células B. Swendeman y Thorley-Lawson (118) encuentran una actividad BDGF en preparaciones purificadas de CD23s de 25 y 12 Kda en células B normales activadas con anti-IgM y en células B transformadas por EBV.

Los estudios de Delespesse y col. (29) sugieren que estos fragmentos juegan un papel crítico en la proliferación de las células B inducida por IL-4, pero no por otras citoquinas con actividad BCGF. La proliferación de células B inducida por coestimulación con anti-IgM e IL-4 es bloqueada con anticuerpos monoclonales anti-CD23 o su fragmento F(ab')₂. Sin embargo, no inhibe la proliferación de las mismas células coestimuladas con

anti-IgM e INF-gamma, o IL-2 o LMW-BCGF. Fragmentos purificados de CD23s disparan la proliferación de células B cuando se usan junto con anti-IgM. Estas preparaciones contienen una mezcla de fragmentos de 33 y 25 Kda que ligan IgE y fragmentos de 12 Kda no ligadores; sin embargo, la actividad BCGF no es bloqueada por anticuerpos monoclonales anti-CD23 dirigidos contra el lugar de unión del FcεRII a la IgE. En este mismo sistema estos autores no encuentran activo al fragmento altamente purificado de 25 Kda, por lo que suponen que la actividad BCGF del CD23 soluble estaría mediada por el IgE-BF de 33 Kda o por el fragmento no IgE-BF de 12 Kda. Se ha planteado la posibilidad de que estos fragmentos se reasocien de nuevo en la superficie celular a través de receptores específicos, aunque estos no se han evidenciado (119).

Una posibilidad cada vez más evidente en la actividad BCGF-like del FcεRII soluble es que puede requerir de otros componentes, como por ejemplo, una interacción célula-célula o bien que la actividad sólo se manifiesta en la proximidad inmediata de su producción (104).

Por otra parte, se ha sugerido que la expresión ectópica o sobreexpresión del CD23 en algunos subtipos celulares (fundamentalmente células B) podría contribuir al crecimiento incontrolado asociado a las enfermedades malignas donde el CD23 está expresado en cantidades anormales (120).

2- Factor de diferenciación de células B y T:

Existen estudios que muestran que el CD23s podría ser un factor de diferenciación de las células B (BCDF) y parece que esta actividad residiría en el fragmento de 12-15 Kda (30). Por otra parte, el IgE-BF de 25 Kda en sinergia con la IL-1 son capaces de inducir la diferenciación in vitro de las células pre-T CD2-, CD3-, CD4-, CD8- (timocitos precoces) no respondedoras a la IL-2 a células T CD2+, CD3+, CD4+, CD8+ respondedoras a la IL-2 (121).

3- Actividad inhibitoria de la migración de macrófagos:

Flores-Romo y col. (122) han observado que los CD23s (purificados) inhiben la migración espontánea de los macrófagos (línea celular U937), y que anticuerpos anti-CD23 (anticuerpo MHM6) inhiben específicamente esta actividad MIF, que por otro lado, es un importante parámetro en el lugar de la inflamación.

4- Regulación de la síntesis de IgE humana:

El efecto de los IgE-BF en la sobre o infrarregulación de la IgE es desconocido hasta la fecha, y los datos de los distintos autores son contradictorios.

Desde hace varios años se sabe que el sobrenadante del cultivo de células B FcεRII/CD23+ era capaz de potenciar la síntesis de IgE de las células B de donantes atópicos (123) (124). Este sobrenadante también inhibe la unión de la IgE a las células que llevan FcεRII y puesto que las dos actividades podían ser abolidas en un ensayo IgE-inmunoabsorbente se sugirió que estaban mediadas por IgE-BFs. Más recientemente se ha encontrado que los IgE-BFs liberados de células T de pacientes asmáticos con IgE sérica elevada aumentan la síntesis de IgE de linfocitos B (125).

La sangre procedente de individuos atópicos contiene linfocitos que han sido activados "in vivo" y que segregan IgE cuando se cultivan en ausencia de ningún estimulante. Esta sobresíntesis se ve incrementada por la adicción al medio de CD23s e inhibida con anticuerpos monoclonales anti-CD23 y lo que es de gran importancia, lo hacen de forma isotipo-específica (4). Este efecto se ha comprobado con IgE-BFs altamente purificados o recombinantes (6) lo que parece otorgar al CD23 o a sus fragmentos solubles algún papel en la regulación de la síntesis de la IgE.

No obstante, el CD23s purificado del sobrenadante de líneas celulares B o recombinante es ineficaz, por sí mismo, de inducir la producción de IgE y necesita, de forma sinérgica, concentraciones subóptimas de IL-4 (4) (5). Es conocido que esta interleukina dispara la síntesis de IgE en cultivos de células mononu-

cleares tanto en sujetos atópicos como normales, aunque más en los primeros; de hecho parece ser el único inductor directo "per se" de la síntesis de IgE en linfocitos B normales (6) (4), pero también conocemos que la IL-4 que sobrerregula la expresión del CD23 en las distintas líneas celulares, y particularmente en los linfocitos (93). Como ya se ha comentado, en este modelo, el efecto de la IL-4 como inductor de la síntesis de IgE es estrictamente dependiente de la presencia de células T y monocitos y más concretamente se requiere un contacto directo HLA-restringido entre células T y B (17). De esta forma, la IL-4 puede aumentar la expresión de CD23 y CD23s en linfocitos B altamente purificados pero sin resultar en la producción de IgE en ausencia de células T y monocitos (9) (98).

El empleo de anticuerpos monoclonales anti-IL-4 o anti-CD23 inhibe la síntesis de IgE (9) indicando que la presencia de IL-4 y CD23s es necesaria para que la síntesis sea óptima y que su acción está incluida en la cascada de interacciones multicelulares, directas y a través de citoquinas, que conduce a producción de IgE.

Estos datos sugieren que los IgE-BFs ejercen su efecto interaccionando, directa o indirectamente (vía células T, por ej. aumentando la producción de IL-4, o monocitos) con las células que segregan IgE (47). El mecanismo por el que el CD23s media su efecto modulante en la producción de IgE IL-4 inducida permanece

desconocido.

Existen diferencias en cuanto a la acción de estos dos anticuerpos monoclonales (anti-IL-4 y anti-CD23). En el modelo conducido por IL-4 la respuesta IgE sólo se bloquea por el anti-IL-4 cuando este se añade en los primeros 4-6 días de los 12 días del periodo de cultivo en orden a inducir síntesis de IgE. En contraste, el anti-CD23 todavía tiene efecto inhibitorio después del día 6, aunque en menor grado que en los primeros días. Parece que el anti-CD23 actúa tanto en el primer estadio (IL-4 dependiente) como en el más tardío (IL-4 independiente) de la síntesis inducida por IL-4 (126).

Mecanismos de acción del anti-CD23 en la síntesis de IgE:

El efecto supresivo del anti-CD23 en la síntesis inducida por IL-4 puede explicarse tanto por una acción directa del anticuerpo en las células FcεRII positivas como por la neutralización de los IgE-BFs. Sin embargo, al menos hay que considerar 3 mecanismos por los que los anti-CD23 que pueden ejercer esa acción:

- 1- El anti-CD23 neutraliza la actividad de los fragmentos solubles o previene su liberación. Según los estudios de Bonefoy (12) la capacidad de un anticuerpo monoclonal anti-CD23 para inhibir la síntesis de IgE está relacionada con su capacidad para prevenir la división del FcεRII en IgE-BFs. De hecho, no todos

los anti-CD23 tienen la misma actividad supresora de la síntesis de IgE incluso aunque vayan dirigidos contra el mismo dominio de la molécula de CD23 (incluyendo el dominio por el que se une a la IgE) (126).

De cualquier forma, el hecho de que las células que segregan IgE no expresen FcεRII (40) indica que gran parte de efecto inhibitor del anti-CD23 puede deberse a la neutralización de los IgE-BFs (47).

2- El anti-CD23 previene el contacto directo célula a célula que se sabe que es esencial para la síntesis de IgE. Esto hablaría a favor de la función como molécula de adhesión del CD23.

3- El anti-CD23 interactúa con todas las células FcεRII positivas. Como las células que producen IgE (células plasmáticas) pierden la expresión del CD23 en su membrana (40) no puede influir sobre estas células mediante una señal directa. No obstante, existe la posibilidad de que el anti-CD23 induzca la liberación de determinados inhibidores de la síntesis de IgE de otras células FcεRII positivas, por ejemplo, la liberación de PGE2 por los monocitos (126).

¿Existe relación causal entre el CD23 y la producción de IgE?

De cualquier forma, no siempre se ha encontrado una relación

directa entre la síntesis de IgE y la producción de CD23s, y algunos autores como Sarfati y col. (4) y Chretien y col. (3) observan que en los cultivos de donantes sanos y atópicos la producción de CD23s y la expresión del CD23 en linfocitos B puede ser independiente de que las células produzcan o no IgE al ser estimuladas con IL-4 recombinante. Dicho de otra forma, la expresión de CD23 y la liberación de sus fragmentos solubles no resulta necesariamente en la producción de IgE.

Aunque la expresión del CD23s parece estar asociada con la síntesis de IgE IL-4-inducida, la IL-4 también induce la expresión del CD23, y subsiguiente liberación de CD23s, en células esplénicas altamente purificadas con similar cinética que en las células mononucleares sanguíneas, pero sin promover la síntesis de IgE (127). De esto se deduce la complejidad de los mecanismos que regulan la síntesis de IgE.

Los escasos trabajos que se han realizado "in vivo" tampoco hablan a favor de una relación consistente entre la producción de IgE-BFs y la síntesis de IgE. En este sentido, Yanagihara y col. (90) observan que, aunque en los individuos alérgicos los niveles séricos de CD23s están significativamente más elevados que en los controles sanos de la misma edad, existía gran variabilidad entre los sujetos y la correlación con la IgE sérica era demasiado débil como para pensar en una relación causal. Por otro lado, en ese mismo estudio, la época de polinización no

influyó en los niveles de IgE-BFs en los polínicos, cuando se sabe que sí afecta a los niveles de IgE. Kim y col. (91) sólo encuentran un aumento significativo de los niveles de CD23s en los niños menores de 8 años mientras que entre los de 8 a 15 años esa diferencia no es significativa (sólo estudió 37 alérgicos y 41 controles) a pesar de diferencias en los niveles de IgE, y sólo en los niños más jóvenes encontraron una cierta correlación entre niveles altos de CD23s con niveles también altos de IgE.

A continuación, en la tabla IV resumimos las funciones supuestas del CD23 y CD23s.

Tabla IV

FUNCIONES PUTATIVAS DEL CD23 Y CD23 SOLUBLE

FUNCION DEL FcεRII/CD23	FUNCION DEL CD23 soluble
Regulación del crecimiento de las células B	Regulación del crecimiento de las células B
Adhesión celular	Factor de diferenciación de células B y T
Presentación de antígeno	Inhibición de la migración de macrófagos
Citotoxicidad por anticuerpo	Regulación síntesis de IgE
Inflamación	
Regulación síntesis de IgE	

11- SIGNIFICADO CLINICO DEL CD23/CD23s

Existe algún resultado preeliminar que sugiere que niveles aumentados de FcεRII/CD23 sérico en sangre de cordón umbilical pudieran tener un valor predictivo para el posterior desarrollo de síntomas atópicos (91). Si esto se confirmarse sería interesante pues la IgE en cordón a veces es difícil de detectar por sus niveles demasiado bajos mientras que el CD23s se detecta con facilidad.

Suemura y col. (41) han observado que tras el tratamiento hiposensibilizante en pacientes asmáticos alérgicos a ácaros y también tras la disminución de alérgenos ambientales en alérgicos a ácaros y cedro rojo se produce una disminución tenue pero significativa de los niveles de FcεRII/CD23 sérico, por lo que se sugiere que ese nivel sérico puede ser un buen indicador de la evolución de la enfermedad alérgica y de la eficacia de las medidas de desensibilización.

De la misma manera que se ha observado "in vitro" la prevención de la infección por VIH utilizando moléculas de CD4 (128) y en vista de los hallazgos que indican que las zonas de unión de la IgE con el FcεRI y FcεRII están muy cercanas (37) (27) y bastante superpuestas en el dominio Ce3, se examinó la posibilidad de que el CD23s recombinante pudiera interferir con la unión de la IgE a células FcεRI positivas (46) (41). Se estudió la

formación de rosetas IgE en basófilos en presencia y ausencia de FcεRIIs recombinante observándose un efecto inhibitor sobre esta formación de rosetas de forma dosis dependiente (entre el 50 y 90% según el donante). De igual forma, se inhibió la liberación de histamina de los basófilos cuando se añadía previamente al suero sensibilizante CD23s recombinante en cifras comparables a las necesarias para la inhibición de la formación de rosetas. Así pues, el CD23s recombinante suprimía la unión de IgE y las funciones mediadas por esta no sólo en células FcεRII+, sino también en basófilos que expresan FcεRI.

Estos datos sugieren que el FcεRII puede ejercer una función de control negativo sobre los anticuerpos IgE en las zonas de reacción alérgica, en las que las concentraciones de CD23s pueden ser relativamente altas debido a que la expresión de CD23 está aumentada en monocitos y linfocitos B en atópicos. Sin embargo, se necesitaron concentraciones elevadas de CD23s recombinante para inhibir la unión de la IgE al FcεRI. La aplicación práctica de estos hallazgos está evidentemente lejos.

Mediante un mab contra el FcεRII sérico dirigido contra un epítipo no relacionado con la unión a la IgE y otro mab anti-e (ELISA con doble anticuerpo) se ha observado (41) en sujetos normales que el 60% del CD23s se encontraba formando complejos con IgE, mientras que en los atópicos era aproximadamente el 30%. Estos datos sugieren que la formación de complejos CD23s-IgE

podría verse alterada en atópicos a pesar de los niveles elevados de CD23s e IgE en suero. Se sugiere además que el CD23s podría estar implicado en la neutralización de la IgE lo que pone de relieve el significado funcional del CD23s en la regulación negativa de las reacciones alérgicas.

JUSTIFICACION DE LA TESIS

Cuando se abordan en la literatura médica las publicaciones referentes al receptor de baja afinidad para la IgE sorprende la escasez de trabajos clínicos que se han realizado y particularmente en individuos atópicos, a pesar del amplio conocimiento que tenemos hoy de su estructura molecular y genética. De esta manera, casi todas las funciones del FcεRII y la de sus fragmentos solubles se han documentado mediante estudios realizados "in vitro", en cultivos celulares, y su significado fisiológico real aún permanece desconocido.

Como se sabe, el nivel de IgE total sérica está a menudo incrementado en los individuos alérgicos, y por otra parte, como ya hemos documentado en la introducción, al menos en los sujetos altamente atópicos se ha encontrado una sobreexpresión del FcεRII/CD23 en los linfocitos. Esto sugiere que los linfocitos FcεRII/CD23+ pueden participar de algún modo, en la regulación de la síntesis de IgE "in vivo", quizás por medio de los fragmentos solubles del CD23 pues se ha observado que estos pueden potenciar la síntesis "in vitro" de IgE (4). Sin embargo, no hay acuerdo entre los diversos autores en la manera que actuaría el CD23 en la regulación de la IgE ni tampoco en la correlación entre las formas solubles y las concentraciones de IgE.

Si el CD23s juega un papel en la síntesis "in vivo" de la IgE, en primer lugar, su nivel sérico debería ser significativamente diferente entre los individuos alérgicos y no alérgicos, y en segundo lugar, debería haber una cierta correlación entre su título y el de la IgE. Con este supuesto nosotros investigamos el nivel sérico del CD23s en condiciones clínicas seleccionadas donde estas moléculas podrían tener un papel como se ha sugerido por los estudios "in vitro".

Nos interesamos no sólo por ver la correlación existente entre el CD23s y la IgE, sino también por el posible vínculo con la IgG4 sérica, apoyándonos en los estudios "in vitro" que encuentran que la IL-4 induce un aumento en la producción de la IgG, y particularmente de la IgG4 (además de la IgE y del CD23) (10) (6). De esta manera, podemos observar si el nexo de unión entre la regulación de ambas inmunoglobulinas por la IL-4 puede estar en el CD23s, o en cualquier caso si existe relación entre el nivel de IgG4 sérica y el CD23s. Recordemos, por otra parte, que la IgG4 puede estar aumentada en sujetos atópicos, particularmente en la dermatitis atópica. A este respecto, se ha encontrado en pacientes con dermatitis atópica una correlación negativa entre la producción de IFN-gamma "in vitro" y la concentración sérica de IgG4 (129).

Parámetros como el número de sensibilizaciones alérgicas en cada paciente, los años de evolución de la enfermedad o el grado

de afectación clínica en pocos o en ningún trabajo se han considerado, por lo que creímos importante incluirlos en nuestro estudio. Alguno de estos parámetros podría otorgar al CD23 o a sus fragmentos solubles algún valor bajo el punto de vista clínico.

Si el número de publicaciones sobre aspectos clínicos del CD23s en sujetos atópicos es bajo, como es de esperar, los estudios sobre el FcεRII/CD23 de la membrana celular también es escaso. La mayoría de estos trabajos están apoyados en cultivos celulares (94), han considerado un escaso número de pacientes o parten sólo de individuos altamente atópicos (63), y como ya comentamos en la introducción los resultados de los distintos autores a veces son discrepantes.

En este sentido, para clarificar el papel del FcεRII/CD23 en la patogénesis de la rinitis y asma atópicos, nos pareció interesante analizar la expresión de este receptor en los subtipos más importantes de linfocitos procedentes de sangre periférica de pacientes con estas patologías y observar la correlación existente entre las distintas poblaciones celulares CD23+ y el CD23s e IgE total sérica, por si alguna de estas poblaciones tuviera mayor influencia que otras en la contribución al CD23s y a la posible regulación de la IgE.

Curiosamente, en los trabajos revisados, observamos que la

mayoría de los autores prestan mayor atención al porcentaje de células que son CD23+, obviando la densidad de receptores por célula, es decir, el número de moléculas de FcεRII/CD23 que posee en su membrana cada célula. Esto a priori, nos pareció interesante pues la densidad de receptores por célula podría tener alguna importancia funcional, ya que de igual trascendencia podría ser que una célula expresase más o menos receptores en su superficie como que se detectasen más células con el receptor. En nuestro estudio, nos propusimos investigar ambas posibilidades.

CAPITULO II:
MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

I- PACIENTES Y CONTROLES

1.- *Pacientes del estudio:*

Hemos estudiado a 254 individuos que presentaban una clínica de rinitis, asma bronquial o dermatitis atópica, todos ellos pacientes de las Consultas Externas de nuestro Servicio de Inmunología y Alergia.

Consideramos sujetos con asma bronquial aquellos que presentaban episodios recurrentes de sibilantes o disnea, en los que de forma espontánea o tras el tratamiento broncodilatador ocurría una mejoría parcial o total de los síntomas. Los pacientes incluidos como rinitis fueron aquellos que aquejaban los síntomas clásicos de esta enfermedad (obstrucción, rinorrea, estornudos, prurito, hiposmia), bien de forma estacional o perenne. Finalmente, un grupo aparte lo constituyó la dermatitis atópica, evaluados aplicando los criterios diagnósticos de Rajka.

Consideramos individuos con patología respiratoria atópica a aquellos que presentaban una clínica sugerente, con al menos un test cutáneo positivo dentro de la batería de alérgenos testados, que más adelante especificaremos. El rango de sensibilizaciones cutáneas osciló entre 1 y 12. El resto fue considerado patología

no alérgica.

De este modo, los grupos que desglosamos, atendiendo a la patología, fueron los siguientes:

- a.- Rinitis alérgica: n= 61
- b.- Rinitis no alérgica: n= 12
- c.- Asma bronquial extrínseco: n=19
- d.- Asma bronquial intrínseco: n= 16
- e.- Rinitis y asma bronquial no alérgicos: n=16
- f.- Rinitis y asma bronquial alérgicos: n=120
- g.- Dermatitis atópica: n=10

Establecimos de forma subjetiva una graduación en cuanto a la gravedad de la enfermedad, valorando la clínica de 1 a 3 (1= leve; 2= moderada; 3= intensa). A este efecto, en el asma realizamos la siguiente valoración:

	<u>Asma leve</u>	<u>Asma moderada</u>	<u>Asma intensa</u>
Tos y sibilancias	1-2/semana	1-2/semana	diarias
Inter crisis	asintomático	sibilancias moderadas	sintomático
Tolerancia esfuerzo	normal	disminuida	mala
Asma nocturna	1-2/mes	2-3/semana	2-3/semana
Actividad laboral	normal	afectada	absentismo

En el caso de la rinitis se realizó una valoración atendiendo fundamentalmente a la intensidad de los síntomas referidos por los pacientes y a la necesidad de medicación. La graduación, al igual que en la dermatitis atópica, fue realizada por mismo médico.

Sobre este conjunto de pacientes descritos nuestro trabajo se dividió en dos partes. En la primera parte estudiamos, en el total de los pacientes, una serie de parámetros clínicos (que a continuación detallamos) y serológicos (IgE total, IgG4 total y CD23 soluble).

Figura 1

PARAMETROS VALORADOS EN LA PRIMERA PARTE DEL ESTUDIO

EDAD
CLINICA
INTENSIDAD DE LA CLINICA VALORADA DE 1 A 3
AÑOS DE EVOLUCION DE LA ENFERMEDAD
NUMERO DE SENSIBILIZACIONES CUTANEAS
IgE TOTAL SERICA
CD23 SOLUBLE
IgG4 SERICA

La edad, sexo, intensidad de la clínica y el tiempo de evolución de la enfermedad de los individuos participantes del estudio se detallan en la tabla I del apartado de figuras y tablas del capítulo III.

En una segunda parte, en un grupo más reducido de pacientes, analizamos la expresión del CD23 en los linfocitos. Este grupo se constituyó por 29 pacientes (18 asmáticos y 11 rinitis). A continuación detallamos las particularidades respecto a la recolección de muestras en cada parte del estudio.

A- Condiciones para la extracción del suero:

Obtuvimos suero de sangre venosa de los 254 individuos con clínica de rinitis, asma o dermatitis atópica.

Todos los sujetos alérgicos presentaban hipersensibilidad a al menos un alérgeno que ocasiona clínica perenne, o en su defecto (polínicos) el suero fue obtenido en la estación sintomática (primavera). La recolección de sueros se realizó entre los meses de Abril y Noviembre del mismo año.

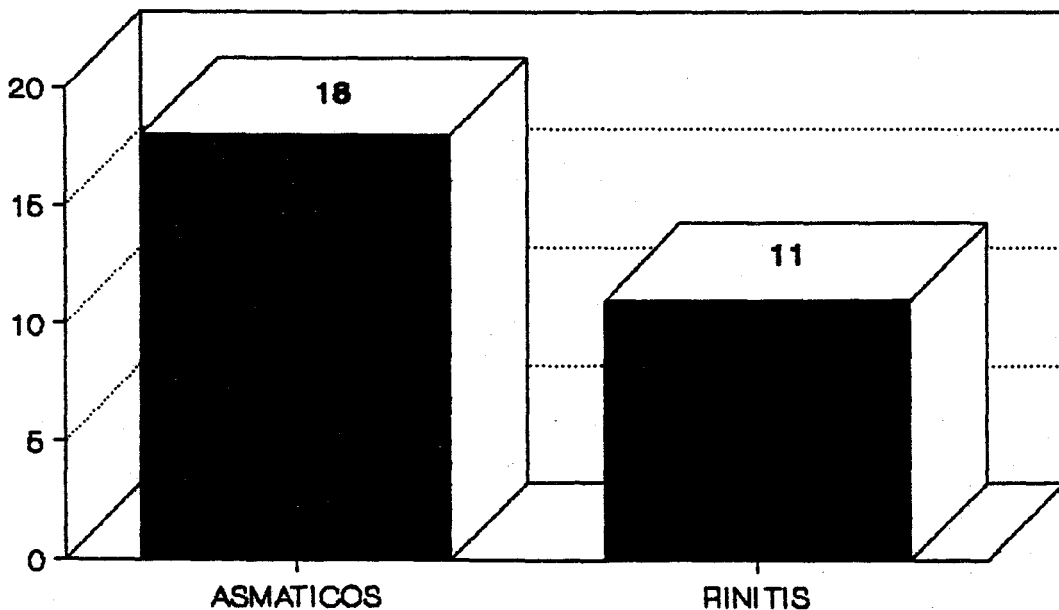
Ningún paciente estaba o había estado sometido a inmunoterapia, ni habían recibido corticoides sistémicos ni tópicos en los últimos dos meses. Antihistamínicos, broncodilatadores o cromoglicato disódico se suprimieron al menos 72 horas antes de

la extracción de sangre. En los asmáticos se admitieron los beta miméticos inhalados 6 horas antes. Durante las dos semanas precedentes todos los pacientes (y controles) habían estado libre de infecciones.

B- Estudio de subpoblaciones linfocitarias:

El estudio de las subpoblaciones linfocitarias y CD23, que constituía nuestra segunda parte del trabajo, se llevó a cabo en 29 pacientes atópicos todos ellos incluidos también en la primera parte del trabajo, y por lo tanto con los mismos criterios de inclusión. De ellos, 11 tenían rinitis extrínseca y los 18 restantes asma extrínseca (fig. 2), en ambos grupos con hipersensibilidad mediante test cutáneos a Der. Pteronyssinus y Farinae.

PACIENTES DEL ESTUDIO EN SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS



La extracción de la sangre de estos sujetos se realizó durante el mes de Noviembre. Obtuvimos sangre venosa de los 29 pacientes, introduciendo 10 cc en un tubo que contiene heparina sódica en una proporción final de 10 U/ml.

El rango de edad de estos grupos osciló entre 6 y 39 años. En las tablas IIIa y IIIb del apartado de figuras y tablas del capítulo III se detallan las edades y tiempo de evolución de la enfermedad para cada paciente.

2.- *Controles normales:*

A- *Controles del CD23 soluble:*

Constituyeron este grupo 65 sujetos españoles caucasianos, de edades comprendidas entre 17 y 42 años, sin historia personal ni familiar directa de enfermedades alérgicas, y con unos valores séricos de IgE total por debajo de 100 kU/l (CAP system). Este grupo nos sirvió fundamentalmente para establecer nuestros propios valores de normalidad para el CD23s.

Los sueros se obtuvieron del Banco de Sangre de nuestro hospital, previa información y entrega de un pequeño cuestionario al personal encargado de las extracciones para la exclusión de los pacientes con antecedentes alérgicos y otras enfermedades.

Todos los sueros incluidos en el trabajo se conservaron en varias alicuotas de 0.5 cc a -40°C , hasta su procesamiento.

B- Controles del estudio en células:

Lo constituyeron 15 individuos adultos, voluntarios sanos, todos ellos trabajadores de nuestro hospital, de edades comprendidas entre 25 y 37 años. La IgE sérica de estos controles siempre estaba por debajo de 100 kU/l. Constituyó fundamentalmente el grupo control de la expresión del CD23 en linfocitos.

II- TEST CUTANEOS

Los test cutáneos se realizaron siguiendo la técnica del prick-test, según procedimiento descrito por Morow-Brown (130). El objetivo es reproducir localmente en la piel un reacción alérgica tipo I.

Esta prueba se realiza colocando una pequeña gota de cada extracto de prueba y de la solución control (PBS para el control negativo y fosfato de histamina al 1/100 para el control positivo) en la cara volar del antebrazo. Las gotas las separamos unos 2 cm entre sí, marcando con rotulador los puntos que se punccionan. Con una lanceta de una punta de 1 mm y unos topes a los lados para que no penetre en la piel, se presiona de forma mantenida en un ángulo de 90° a la superficie cutánea a través de la gota de la solución. No debe haber sangrado y debe aplicarse siempre la misma presión.

La lectura se realiza a los 15 minutos. Se consideró positivo el test cuando aparecía una pápula igual o superior a la inducida por la histamina o que, aún siendo algo menor, presentase pseudópodos.

El material requerido es el siguiente:

-Algodón.

- Alcohol.
- Rotulador para marcar la piel.
- Lancetas tipo Morrow-Brown.
- Extractos alérgicos glicerinados colocados por orden (Laboratorios Abelló).
- Controles negativo (PBS) e histamina al 1/100.
- Papel secante

III- ANTIGENOS PARA TEST CUTANEOS

A todos los pacientes se les realizaron test cutáneos con una batería de neumoalergenos habituales (Abelló Lab.) donde se incluyeron:

Acaros:

- Der. Pteronyssinus
- Der. Farinae
- Lepidoglyphus destructor
- Acarus siro

Hongos:

- Alternaria
- Cladosporium
- Aspergillus

Pólenes:

- | | |
|---------------------|----------------------|
| - Gramineas: Phleum | - Malezas: Artemisia |
| Lolium | Parietaria |
| Dactylis | Rumex |
| Festuca | Chenopodium |
| Cynodon | |
| Poa | |
| - Arboles: Olivo | |

Animales: - Perro - Gato

IV- DETERMINACION DE LA IgE TOTAL

Se determinó mediante la técnica CAP de Pharmacia. Esta técnica es un test "in vitro" basado en tecnología inmunoCAP para la determinación de IgE circulante. Una anti-IgE, unida covalentemente a un inmunoCAP, reacciona con la IgE de la muestra de suero. Después de un lavado, anticuerpos anti-IgE marcados con una enzima se añaden para formar un complejo. Después de una incubación y un nuevo lavado se realiza incubación con una sustancia de desarrollo. Se detiene la reacción y la fluorescencia es medida en un fluorímetro.

Reactivos empleados

- Anti-IgE-enzima, beta-galactosidasa (antisuero de conejo/mo-
noclonales de conejo).
- Aditivo para solución de lavado. Solución de lavado con-
centrada.
- Solución de desarrollo.
- Solución de inhibición.
- Estándares:
 - Anti-IgE CAP (antisuero de cordero), 16 inmunoCAP en un
tubo portador.
 - Estándares IgE, concentraciones: 0.25, 0.7, 3.5, 17.5,
50, 100 kU/l.
- CAP anti-IgE, CAP Alergenos, en tubos de 10 o 16 inmunoCAP

(sólo para detección de IgE específica).

Material

- Microplacas de dosis.
- Microplacas de lectura.
- Reglilla para la colocación de las placas.
- Distribuidor de los inmunoCAP.
- Programa de ordenador, denominado "PHAMAS".
- Guía de posición de los 96 pocillos.
- Soporte de los tubos que poseen en su interior inmunoCAP.
- InmunoCAP facticios.
- Contador de Fluor 96 (Fluorocomputador).
- Ensayo de lavado 96 que incluye:
 - * "Rastrillo" de transferencia de inmunoCAP.
 - * Bandeja.
 - * Recipiente para la lectura de las microplacas.
 - * Bloc de espaciamiento.
- Micropipetas a las que se les pueda adaptar puntas de plástico monouso.
- Tubo cilíndrico graduado hasta 1000 ml.
- Papel milimetrado para la grabación de los resultados.

Procesamiento

1. Preparar una bandeja con dos microplacas, una en el medio y

otra a la derecha. Colocar una microplaca de lectura con su recipiente a su derecha y posar la reglilla por debajo.

2. Adjuntar a la placa que está en medio los CAP anti-IgE para los estándares inmunoCAP apropiados para las muestras no conocidas. Si existe alguna línea incompleta rellenar los huecos con inmunoCAP facticios.

3. Pipetear 50 μ l de estándares y de muestras no conocidas en la microplaca de la izquierda.

4. Poner en marcha el lavador AW 96 con solución de lavado.

5. Cargar la bandeja en lavador AW 96, comenzar el lavado; bandeja en posición 1 -prelavado-.

6. Poner la bandeja en posición 3, en frente de la estación de lavado. Transferir con la ayuda de un distribuidor de transferencia los inmunoCAP, línea por línea en las microplacas que contienen las muestras.

7. Incubación de las muestras 30 minutos.

8. Antes de terminar la incubación pipetear 50 μ l de anti-IgE enzima, en cada pozo de la microplaca del medio.

9. Lavar los inmunoCAP en el lavador AW 96, posición 2, lavado de muestras.

10. Transferir los inmunoCAP línea por línea a la microplaca del medio.

11. Incubar durante 150 minutos.

12. Lavar los inmunoCAP en el lavador AW 96, posición 1, lavado del conjugado.

13. Pipetear 50 μ l de solución de desarrollo en cada pocillo de

la micropipeta de la placa izquierda (inicialmente la placa de muestras).

14. Transferir, con la ayuda del peine de transferencia, los inmunoCAP, línea por línea, de la placa del medio a la placa de la izquierda, que contiene la solución de desarrollo.

15. Incubar 15 minutos.

16. Dos o tres minutos antes de finalizar la incubación, transferir los inmunoCAP, línea por línea, de la microplaca de la izquierda a la bandeja de la derecha.

17. Verter la solución de inhibición en el recipiente de espaciado del lavador AW 96. Poner la bandeja en el lavador. Después de 10 minutos de incubación con la solución de desarrollo, proceder a retirarla en el AW 96.

18. Desde que está ajustada toda la solución de inhibición, la AW 96 emite un señal sonora, sacar la bandeja con precaución, esperar 2 minutos.

19. Medir la fluorescencia emitida en el Fluorocomputador FC 96, de acuerdo con las instrucciones del manual de utilización. La concentración en la muestra de los pacientes se compara con la curva estándar. Los resultados se expresan en kU/l.



IV- DETERMINACION DE IgG4 TOTAL

La determinación de IgG4 se realizó mediante técnica de inmunodifusión radial simple, ensayo que permite la detección cuantitativa de proteínas empleando un antisuero (en nuestro caso anti-IgG4) que se encuentra apropiadamente diluido en gel de agarosa. Este procedimiento deriva de los trabajos iniciales de Mancini y col. (131). En esta técnica, en el punto final de la difusión, el área del anillo de precipitación es directamente proporcional a la concentración del antígeno (en nuestro caso la IgG4). Cuanto más alta sea la concentración del antígeno mayor será el diámetro del anillo.

Las placas usadas en nuestro estudio fueron proporcionadas por Biodiagnostic SA (Human IgG subclases single dilution RID Kits).

El procedimiento seguido fue el denominado "método tabular-punto final" donde comparamos los resultados de las muestras con unas tablas de referencia aportadas en el propio kit.

El material requerido para esta técnica es:

- Placas de inmunodifusión: son las placas donde se encuentra diluido apropiadamente en agar la anti-IgG4.
- Muestras estándar: calibrador prediluido contenido en el kit.

- Micropipetas de 5 μ l: dosificadores de precisión.
- Suero problema: muestra que queremos cuantificar.
- Tubos de ensayo.
- Dispositivo de medición: regleta o visor graduado. En nuestro caso utilizamos el "calibrating viewer" de Kallestad.
- Tablas de referencia: cada diámetro de la muestra se corresponde con un valor de concentración sérica de la IgG4.

Método

- Llenado de pocillos: destapamos la placa y se deja reposar al aire unos cinco minutos en caso de que haya condensación de agua en los pocillos. Se depositan 5 μ l del calibrador neto en el primer pocillo y de las muestras en los restantes, sin diluir.
- Incubación: después de la aplicación de las muestras se tapa la placa y se incuba a temperatura ambiente (22°C) durante unas 72 horas para completar la difusión.
- Control de calidad: el diámetro del anillo del calibrador una vez completada la difusión debe estar en el rango 8.7-9.3 mm.
- Lectura: se realizó con una lupa graduada. El valor del anillo del diámetro de cada muestra era extrapolado directamente a la

tabla de referencia que proporciona el kit, obteniéndose valores de concentración en mg/l.

V- DETERMINACION DE CD23 SOLUBLE

Se determinó mediante enzimoimmunoensayo "tipo sandwich" (EIA) (CELLFREE CD23 test kit, T Cell Sciences, Inc).

Someramente, el ensayo consiste en lo siguiente. Un anticuerpo monoclonal anti-CD23 se fija en micropocillos. Las muestras y standards se introducen en los pocillos seguido inmediatamente de la adicción de un enzima conjugado con un anticuerpo monoclonal anti-CD23. El CD23 soluble de las muestras o standards se une al anticuerpo fijado en los pocillos mientras el anticuerpo conjugado se une a un segundo y distinto epítipo de la molécula de CD23s, completando el sandwich. Una vez lavados, se añade a los pocillos una solución cromógena proporcionando una coloración final proporcional a la cantidad de CD23s presente en la muestra. La reacción se detiene con una solución stop y se realiza la lectura con una absorbancia de 490 nm. La preparación de una curva standard permite calcular los valores desconocidos.

Material

- Placas microtiter con 96 micropocillos donde se ha fijado el anticuerpo monoclonal murino frente al CD23 humano.
- Un vial con el anticuerpo monoclonal murino anti-CD23 conjugado con peroxidasa.
- Un vial diluyente de las muestras: solución tamponada.

- CD23 standards: seis viales, cada uno contiene CD23 humano liofilizado y soluble, excepto el estandard cero. Se acompaña de solución tamponada para su reconstitución. Cada vial posee una concentración determinada para cada nivel de estandard.
- Seis tabletas de substancia cromógena: O-fenilendiamina.
- Diluyente substrato (un vial de 30 ml).
- Sal de PBS
- Un vial de una solución de surfactante al 50%.
- Solución stop: $2\text{NH}_2\text{SO}_4$.
- Micropipetas de precisión de 50 y 100 μl .
- Multipipetas regulables de 50 a 200 μl .
- Probetas y tubos de ensayo para la preparación de los reactantes.
- Fotómetro con filtro para una absorbancia de 490 nm.

Método

A- Recolección de muestras:

Son válidos para el ensayo suero o plasma citratado pero no el empleo de EDTA o plasma heparinizado. Nosotros empleamos suero que se conservó a -40°C hasta su procesamiento.

B- Preparación de reactantes:

Excepto la solución cromógena los siguientes reagentes deben prepararse antes de comenzar el ensayo.

1. Buffer de lavado: introducir el contenido del frasco con sal PBS en un litro de agua destilada. Añadir 1 ml de la solución surfactante. Mezclar hasta la disolución completa y conservar a 2-22°C.

2. Estandards: los seis standards liofilizados se reconstituyen con 0.5 ml de agua destilada para cada vial 15 minutos antes de su uso.

3. Solución cromógena: prepararla 15 minutos antes de su uso.

a- Para una placa con 96 pocillos se emplean 4 tabletas del cromógeno.

b- Por cada tableta se añaden 5 ml del diluyente substrato y se agita hasta la disolución completa.

4. Solución stop: añadir con cuidado 5.8 ml de ácido sulfúrico a 80 ml de agua destilada. Agitar bien y conservar a 22-26°C.

C- Protocolo del ensayo:

Colocar a temperatura ambiente todos los reactantes.

- Pipetear en cada pocillo 50 μ l de los estandards primero y luego de las muestras, por duplicado y en orden correlativo siguiendo la numeración de la placa.

- Añadir 50 μ l del anticuerpo monoclonal anti-CD23 en todos los pocillos. Tapar la placa y agitarla suavemente durante al menos 15 segundos para mezclar bien el contenido.

- Incubar durante dos horas y media a temperatura ambiente (22-26°C) en un agitador a 150 rpm.

- Aspirar la solución de los pocillos y lavar 3 veces con 350 μ l del buffer de lavado para cada pocillo, con aspiración entre cada lavado.

- Pipetear 100 μ l de la solución cromógena en todos los pocillos. Incubar a temperatura ambiente durante media hora.

- Pipetear 50 μ l de la solución stop en todos los pozos. Agitar suavemente.

- Realizar la lectura con absorbancia de 490 nm tan pronto como sea posible después de completar el ensayo.

D- Resultados:

Los valores del CD23 soluble se expresan en unidades/ml (U/ml). Mil unidades se definen como la cantidad de CD23 soluble presente en 1 ml del sobrenadante concentrado de T Cell Sciences, Inc. preparación de referencia de una línea celular leucémica humana.

Una vez realizada la curva standard se calculan sobre la misma los valores de las muestras, considerando para cada una de estas la media de la absorbancia de cada duplicado de muestra.

VI- ESTUDIO DE LAS SUBPOBLACIONES CELULARES

1.- Citometría de flujo. Fundamento

Es una técnica que permite medir el número de células que son positivas a un anticuerpo determinado y la cantidad de anticuerpo fluorescente unido a las células.

Una vez que se ha incubado una suspensión de células con un anticuerpo monoclonal determinado, se hace pasar a las células, de una en una, envueltas en un flujo laminar, a través de un haz de rayos laser de argón. La corriente laminar atraviesa un campo de un cristal de cuarzo cuya situación produce el efecto de la formación de gotas que contienen cada una, una célula. Estas pasan a una velocidad constante por un detector de fluorescencia y otro de dispersión de luz, colocados perpendicularmente a ese haz, donde son excitadas por la fuente luminosa del rayo láser, produciéndose una dispersión de la luz y la emisión de fluorescencia, dependiendo del marcador previo.

La dispersión de la luz en la dirección del rayo luminoso está relacionada con el tamaño de la célula. La luz que se dispersa en sentido perpendicular se relaciona con la estructura interna celular (gránulos, retículo etc.).

Las señales luminosas obtenidas por los detectores de

fluorescencia y de la luz dispersada son convertidas en señales eléctricas, que son medidas y enviadas a un computador para su posterior análisis. De este modo, podemos determinar antígenos presentes en las membranas celulares, que definen la estirpe celular y el estadio de diferenciación en que se hallan.

Haciendo pasar a las células teñidas por un campo eléctrico se puede conseguir, además, separar las positivas de las negativas.

2.- Separación de los linfocitos

Los leucocitos mononucleares se separaron mediante centrifugación de la sangre en un gradiente de densidad usando Ficoll Hypaque (Pharmacia), mediante el procedimiento de Boijum (132).

La relación en volumen de éste con respecto a la sangre fue de 2/1. De este manera depositamos 6 cc de Ficoll Hypaque en un tubo de plástico de 10 cc de capacidad. Mediante pipeta Pasteur de plástico depositamos 3 cc de la sangre heparinizada y diluida a la mitad con PBS, dejando resbalar cuidadosamente la misma sobre las paredes del tubo, para que ésta quede por encima del Ficoll. Esta operación se realizó por duplicado, con el fin obtener un mayor volumen de linfocitos. Posteriormente, se centrifugó durante 20 minutos a 2500 r.p.m., obteniéndose un anillo, en virtud de la mayor densidad del Ficoll sobre los

linfocitos, que contiene las poblaciones celulares para estudiar. Los hematies y polimorfonucleares pasan a través del Ficoll por tener mayor densidad que éste. El anillo fue recogido con pipeta Pasteur de plástico, cuidadosamente, evitando la introducción del medio en la misma.

El material recogido fue introducido nuevamente en tubos de plástico de 10 cc y sometido a 2 lavados consecutivos con 10 cc de PBS, a 1500 r.p.m. Tras el segundo lavado se obtiene un botón celular en el fondo del tubo al cual se le añadió 3 cc de PBS para proceder al marcaje de las células mediante los correspondientes anticuerpos monoclonales.

3.- Material

- Ficoll Hypaque (Pharmacia)
- PBS
- Tubos de plástico de 10 cc calibrados en fracciones de 1 cc
- Pipetas Pasteur de plástico
- Centrífuga

4.- Anticuerpos monoclonales utilizados

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón marcados con fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (RD1), y

proporcionados por Coulter Clone en viales de 0.5 ml.

Controles

T8 FITC/B6 RD1	_____	IgG1 FITC/IgG2b RD1
T4 FITC/B6 RD1	_____	IgG1 FITC/IgG2b RD1
B1 FITC/B6 RD1	_____	IgG2a FITC/IgG2b RD1

5.- Marcaje de las células

Se toman 100 μ l de la suspensión de células y se añaden 10 μ l del anticuerpo monoclonal, utilizando controles para cada fluorescencia, compuestos del mismo isotipo que el monoclonal correspondiente, para conocer la fluorescencia indirecta (inespecífica) que tenga esa sangre. Se incuban durante 15 minutos en oscuridad a 4^o C.

A continuación se pasa por Q PREP, en agitación durante 35 segundos, que estabiliza y fija la fluorescencia. Este está compuesto de la forma siguiente:

-IMMUNOPREP (EPICSTM Leukocyte preparation system), de Coulter científica.

-70 ml agente lítico A: -Acido fórmico _____ 1.2 ml/L

-Estabilizador

- 32 ml Estabilizador B: -Carbonato sódico_____ 6 gr/L
-Cloruro sódico_____ 14,5 gr/l
-Sulfato sódico_____ 31,3gr/l
-Estabilizador
- 14 ml Fijador C: -Paraformaldehido_____ 10 gr/L
-Buffers

Después del alineamiento inicial del aparato (EPICS PROFILE II de Coulter), se obtuvieron controles con un anticuerpo monoclonal que reacciona con la subclase de inmunoglobulina del CD a investigar.

6.- Determinación del número de antígenos (CD) por célula

Se calculó la intensidad de fluorescencia media contra la curva de calibración usando bolitas inertes a las que se unieron covalentemente un número conocido de moléculas de fluoresceína o ficoeritrina. Después calculamos la fluorescencia efectiva, relación F/P, de cada anticuerpo monoclonal, para determinar, finalmente, el número de receptores dividiendo la intensidad de fluorescencia media por célula por la relación F/P.

VII- METODO ESTADISTICO

Sobre una muestra de 254 individuos se ha realizado un estudio estadístico de las variables que se han valorado en dicha muestra, así como de los grupos que se han realizado.

Los datos del estudio en suero y de las poblaciones celulares y número de antígenos por célula, fueron analizados mediante el análisis de la covarianza y varianza (ANOVA). Este procedimiento forma parte de un conjunto más amplio de técnicas de investigación estadística correspondientes a lo que se ha dado en llamar "diseño de experimentos", que engloba aquel área de la estadística cuyo objetivo son los métodos de recogida y análisis de los datos, de tal manera que, con el tamaño de muestra mínimo, se obtenga el máximo de información con la mayor precisión posible. El análisis de la varianza fue ideado por Fisher en 1925. Constituye un elegante proceso matemático que permite comparar, indirectamente, varias medias aritméticas obtenidas en diferentes muestras, por medio de la comparación directa de sus dispersiones.

Utilizamos el coeficiente de correlación de Pearson para estudiar la relación entre los diferentes parámetros inmunológicos y clínicos de los pacientes.

CAPITULO III:**RESULTADOS**

RESULTADOS

Pasamos a relatar los resultados de la estadística, fundamentalmente analítica, en las dos partes de que se compone el estudio, dada la importancia de relacionar entre sí los hallazgos más significativos para responder a los objetivos de esta Tesis. ¿Existe correlación "in vivo" en los atópicos entre los niveles del CD23s y los de IgE o IgG4 totales? ¿Hay diferencia con respecto a la patología respiratoria no alérgica? ¿Cómo expresan las distintas subpoblaciones linfocitarias de los atópicos el receptor de baja afinidad para la IgE en relación a los sujetos normales? ¿Es decisiva a este respecto la extensión de la enfermedad atópica? ¿Alguna subpoblación contribuye de forma más determinante al CD23s? ¿La densidad de receptores por célula aporta datos adicionales? ¿Existen correlaciones con la IgE sérica que ayuden a explicar la importancia del CD23 o de las poblaciones celulares que lo expresan en la regulación de esta Ig? ¿Son importantes parámetros como la edad, el número de sensibilizaciones cutáneas o el tiempo de evolución de la enfermedad?.

Estas y otras cuestiones pueden responderse al relacionar entre sí los diferentes parámetros analizados.

I- ESTUDIO EN SUERO

En la tabla I de este capítulo se detallan los resultados de la primera parte del estudio para cada paciente, con todos los parámetros considerados.

A- NIVEL SERICO DE CD23 SOLUBLE

1.- *Controles sanos*

En el grupo de 65 sujetos sanos que sirvieron de control los valores del CD23s oscilaron entre 17 y 252 U/ml con una media de 97. Los valores que indica la compañía que comercializa el kit (T Cell Sciences) en un estudio sobre 188 individuos sanos oscilaron entre 15 y 250 U/ml, por lo que en principio nuestras determinaciones en los controles entran en el rango esperado.

2.- *Rinitis*

En el grupo de rinitis atópica el CD23s estaba claramente por encima de los valores controles con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) (fig. 1). El rango osciló entre 46 y 960 U/ml con una media de 256.

En contraste, en el grupo de rinitis no atópica no hubo

diferencias significativas con respecto a los controles sanos.

Lógicamente, a raíz de estos resultados, encontramos diferencia significativa entre los dos grupos de rinitis, atópica y no atópica, con una $p < 0.0001$ (fig. 2).

3.- Asma

Los pacientes asmáticos extrínsecos, al igual que ocurría con la rinitis, presentaron niveles de CD23 soluble superiores significativamente a los controles ($p < 0.0003$) (fig. 3). El valor mínimo fue de 69 U/ml y el máximo de 785, y una media de 262.

El grupo de asmáticos intrínsecos no se diferenció en cuanto al CD23s del grupo control. En este caso, el valor mínimo fue de 39 y el máximo de 262.

Como sucedía en el caso de la rinitis, también hubo diferencias reseñables entre los asmáticos atópicos y los no atópicos, con una $p < 0.0004$ (fig. 4).

4.- Rinitis y asma

Cuando se analizó el grupo que integraban los sujetos con rinitis y asma extrínsecos de nuevo encontramos diferencias

estadísticamente significativas con los controles ($p < 0.0001$) (fig. 5). El rango del CD23s estuvo entre 28 y 960, con una media de 253.

Si consideramos los pacientes con rinitis y asma no alérgicos, entonces la diferencia con los controles no existió. En este caso, el valor mínimo fue 27 y el máximo 575.

Una vez más, la comparación entre la patología alérgica y no alérgica mostró importantes diferencias, con mayores niveles de CD23s en los atópicos ($p < 0.002$) (fig. 6).

5.- *Dermatitis atópica*

Como ocurrió en las restantes patologías atópicas consideradas en este estudio, los pacientes con dermatitis atópica tenían niveles elevados de CD23s ($p < 0.001$) (fig. 7). Los valores máximo y mínimo de este grupo fueron 58 y 562.

6.- *Comparación entre las diferentes patologías alérgicas*

Los niveles séricos del CD23s en el grupo con rinitis fueron significativamente inferiores a los de los asmáticos ($p < 0.05$) (fig. 8), aunque no existió esa diferencia con los pacientes que padecían de rinitis más asma ni con los de dermatitis atópica (fig. 9 y 10).

El grupo que presentaba únicamente asma no se diferenció del que tenía asma más rinitis (fig. 11) y tampoco de los pacientes con dermatitis (fig. 12).

Finalmente, la muestra de asma más rinitis tuvo niveles de CD23s similares a la de dermatitis atópica (fig. 13).

En resumen, dentro de los distintos grupos estudiados de enfermedades alérgicas la única diferencia significativa en los niveles del CD23s ocurrió entre la rinitis y el asma "puros". Este hallazgo, sin embargo, hay que interpretarlo con cautela porque el número de sujetos con solamente asma (n= 19) era pequeño comparado con los que tenían rinitis más asma (n= 120).

7.- CD23s y edad

Dentro del rango de edad en el que se encontraba nuestra muestra (3-71 años) no hallamos diferencias considerables dependientes de esta variable en el nivel del CD23s en los grupos desglosados con la única excepción de los sujetos con dermatitis atópica. En este grupo hubo correlación inversa entre la edad y el nivel de CD23s con significación estadística ($R = -0.5739$; $p < 0.05$).

En el estudio, tampoco influyó la edad en la cuantificación sérica de la IgE total o IgG4 total en ninguna patología.

8.- *CD23s y número de sensibilizaciones*

En ninguno de los grupos analizados el hecho de presentar mayor o menor número de sensibilizaciones, dentro de la batería de test cutáneos elegida, influyó sobre el nivel del factor soluble del CD23.

En este sentido, los resultados con la IgE total y la IgG4 total fueron similares.

9.- *CD23s, severidad de la enfermedad y años de evolución*

No existieron correlaciones entre el grado de clínica (valorado de 1 a 3) y el FcεRII/CD23s ni en la rinitis, ni en el asma, ni en la dermatitis atópica. El CD23s tampoco se afectó por el tiempo de evolución de la enfermedad.

No encontramos que estos parámetros guardasen relación con las inmunoglobulinas E y G4.

B- CORRELACION DEL CD23s CON LA IgE TOTAL SERICA

El nivel sérico de la IgE en los sujetos alérgicos fué significativamente más alto que lo que se consideran valores normales y más alto que en los individuos no atópicos, superando en algunos casos las 2000 KU/l.

La correlación entre los niveles de CD23s e IgE total no existió, ni positiva ni negativamente. Encontramos resultados muy dispares al intentar asociar ambas variables, de manera que pacientes con cifras de IgE de 2000 KU/l podían presentar tanto niveles bajos como altos de CD23s, como sucedió, por ejemplo, con los casos 70 y 54. En la fig. 14 se representa esta ausencia de correlación en el grupo de asma puro.

Estos resultados se hacen extensivos a todos los grupos de atópicos considerados.

C- CORRELACION DEL CD23s CON LA IgG4 TOTAL SERICA

En los 168 pacientes a los que se determinó la IgG4, los valores de la misma no superaron, o lo hicieron mínimamente, el umbral máximo del rango que se considera normal para cada edad, con unas cifras extremas entre 1 y 1600 mg/l para nuestra muestra.

Como sucedió con la IgE, la IgG4 sérica total no ofreció correlación con los niveles de CD23s.

Por otra parte, no existía correlación entre los niveles de ambos tipos de inmunoglobulinas analizadas en este estudio, con la excepción de la dermatitis atópica donde se correlacionaban de forma positiva y significativa ($R= 0.7487$; $p<0.01$). Precisamente, en este tipo de enfermedad es donde se han descrito las mayores alteraciones de la IgG4 en los sujetos atópicos (129).

II- ESTUDIO CELULAR

En la tabla II se relacionan los parámetros analizados en este estudio.

1- VALORES DE LA IgE TOTAL Y CD23 SOLUBLE

Los resultados obtenidos en los grupos de rinitis y asma, siguiendo la metodología descrita, son los siguientes (tablas IIIa y IIIb):

a) IgE total:

El valor medio de la IgE total en el grupo de rinitis fue de 128 kU/l con una desviación típica de 232. Los valores extremos de la muestra con un rango entre 12 y 679.

En el grupo de asmáticos el valor medio de la IgE fue de 162 kU/l con una desviación típica de 177, un valor mínimo de 26 y un valor máximo de 344.

Mediante la t de Student no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las dos muestras.

b) CD23 soluble:

El estudio de las 11 muestras con rinitis extrínseca dió un valor medio para el CD23s de 168.5 U/ML con una desviación típica de 205. Los valores extremos de la muestra eran 62 y 428.

Para los asmáticos en las 18 muestras estudiadas se obtuvo un valor medio de 176 U/ML con una desviación típica de 246. Los valores extremos fueron 46 y 703.

Entre las dos muestras no hubo diferencias estadísticamente significativas.

2- EXPRESION DEL FcεRII/CD23 EN LINFOCITOS:

Todos los pacientes tenían números absolutos y porcentajes de linfocitos B y T (CD4, CD8) dentro del rango normal y sin diferencias entre los dos grupos y entre los controles.

Siguiendo la metodología descrita se analizó la expresión del FcεRII/CD23 en distintas subpoblaciones linfocitarias obtenidas de sangre venosa periférica. Los resultados obtenidos en estas fueron los siguientes:

1.- *Linfocitos totales.*

A- Análisis porcentual:

Los linfocitos totales de sangre periférica procedentes de 11 pacientes con rinitis extrínseca por hipersensibilidad a *Der. Pteronissynus* y *Der. Farinae* expresaron en su membrana plasmática el receptor CD23 en un porcentaje en torno al 5% (fig. 15) con un valor mínimo de 4.30% y un valor máximo de 8.90%. Estos resultados no se diferenciaron de forma estadísticamente significativa con el grupo de controles sanos no atópicos.

En el grupo de pacientes asmáticos extrínsecos (n=18), también por hipersensibilidad a ácaros del polvo doméstico, sí encontramos, por el contrario, mayor expresión de este receptor en los

linfocitos totales respecto a los controles sanos, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$), así como en relación al grupo de rinitis ($p < 0.05$) (fig. 15). Los valores extremos en esta muestra fueron de 3.30 y 10.10%.

En el grupo control los valores mínimo y máximo fueron 2.90 y 10.20, respectivamente, con una media de 5.38%.

La tabla IV detallan los porcentajes de linfocitos totales CD23+ en cada paciente en los grupos de rinitis y asma, respectivamente. También se detallan los valores de los controles.

B- Análisis de la densidad de receptores:

El cálculo de receptores FcεRII mediante la metodología descrita mostró 2-3 por 10^5 (valores algo inferiores a los de otros autores (94)) lugares de unión del mab por célula, en el grupo de asmáticos, cifra algo superior al grupo control aunque sin diferencia estadísticamente significativa. Sí existió esta diferencia ($p < 0.05$) respecto al grupo de rinitis. El grupo de rinitis no se diferenció de los controles (Fig. 16).

Las tablas Va, Vb y Vc detallan el número de receptores CD23 por célula en las distintas subpoblaciones linfocitarias de cada paciente, en los grupos con rinitis y asma, respectivamente.

2. *Linfocitos B.*

Los resultados porcentuales de los linfocitos B CD23+ en los diferentes grupos quedan expresados en la figura 17.

El análisis estadístico reflejó que en el grupo de rinitis la expresión del FcεRII era significativamente menor que en los controles sanos ($p < 0.05$) y que en los pacientes asmáticos ($p < 0.05$).

Aunque en los asmáticos el porcentaje de células con CD23 era mayor que los controles, la diferencia no fue significativa (Fig. 17).

Los valores extremos en el grupo de rinitis fueron 2.80 y 7.50%; en los asmáticos 1.90 y 8.40%.

Las tablas IIIa y IIIb detallan los porcentajes de células B CD23+ en cada paciente en los grupos de rinitis y asma, respectivamente.

3. *Linfocitos T helper.*

En nuestro trabajo encontramos claramente una subpoblación de linfocitos T helper con expresión de FcεRII/CD23.

A- Análisis porcentual:

En contraste con los hallazgos en los linfocitos B, el CD23 se expresó en un mayor porcentaje de células T helper en el grupo de pacientes asmáticos con referencia a los controles ($p < 0.01$) y al grupo de rinitis ($p < 0.006$) (Fig. 18). Sobre el 0.75% de linfocitos T helper en el total de linfocitos expresaban el FcεRII/CD23, con un valor mínimo de 0.10% y máximo de 1.50.

En la rinitis no hubo diferencias con el grupo control.

B- Análisis de la densidad de receptores:

El cálculo de receptores en los linfocitos T helper de los pacientes atópicos demostró que, tanto en el grupo de rinitis como en el grupo con asma, exponían mayor número de sitios de unión del mab que los controles, datos que se detallan en la fig. 19.

Curiosamente, a pesar de que en el grupo de rinitis no había porcentualmente mayor número de células CD23+ que en los controles, sí existía esa diferencia ($p < 0.02$) en cuanto al número de receptores por célula. Dicho de otra forma, los pacientes atópicos tenían en sus células T helper más moléculas de FcεRII/CD23 que los controles no alérgicos.

Los valores mínimo y máximo para la rinitis oscilaron entre 13.000 y 35.000 lugares de unión del mab. Los valores extremos en el asma fueron 13.900 y 41.300.

Las tablas Va y Vb detallan el número de receptores CD23 por célula en las distintas subpoblaciones linfocitarias de cada paciente, en los grupos con rinitis y asma, respectivamente.

4. *Linfocitos T supresores.*

También pudimos observar expresión de FcεRII/CD23 en un pequeño porcentaje de células T supresoras aisladas "in vivo" tanto en pacientes atópicos como en controles sanos.

A- Análisis porcentual:

Los datos estadísticos indican que en los linfocitos T supresores de donantes atópicos, con rinitis o asma, no se expresa, porcentualmente, más cantidad de células CD23+ que en los controles sanos (fig. 20).

En el asma los valores mínimo y máximo fueron 0.20 y 2%, siempre respecto a linfocitos totales. En la rinitis el rango osciló entre 0.20 y 2.40.

B- Análisis del número de receptores:

No obstante, de nuevo el cálculo de los receptores mostró datos relevantes.

Tanto los pacientes con rinitis como los asmáticos extrínsecos manifestaban en sus células T supresoras CD23+, y al igual que sucedía con los linfocitos T helper, más cantidad de receptores que los controles ($p < 0.04$ y $p < 0.003$ respectivamente).

Los valores extremos de la muestra de asmáticos fueron 11.000 y 63.000. En el grupo de rinitis fue de 19.000 y 66.000.

Una vez más, en el grupo de asmáticos había un incremento significativo de los receptores ($p < 0.05$) en relación al grupo de únicamente rinitis. En la fig. 21 se representan estos últimos datos. Ver tablas Va y Vb.

3- CORRELACION DEL CD23 SERICO Y DE LA IgE TOTAL SERICA CON LOS LINFOCITOS FcεRII/CD23+

Cuando correlacionamos la cantidad de la fracción sérica del FcεRII (CD23s) con las distintas poblaciones de linfocitos (B y T) FcεRII/CD23+ encontramos que en el grupo de asmáticos sólomente existía una correlación directa, no muy fuerte ($R=0.5413$) pero significativa ($p<0.002$), con el número de receptores CD23 en las células CD4+CD23+ (fig. 22). En contraste, no existió correlación con los receptores en el resto de células estudiadas. En la figura 23 queda como ejemplo la ausencia de correlación con la población B1B6.

Por otra parte, había correlación significativa, pero en esta ocasión inversa, entre los niveles de IgE sérica total y el número de receptores FcεRII/CD23, también en la población de linfocitos CD4+CD23+ ($R=-0.5810$, $p<0.01$) (fig. 24), pero tampoco con ninguna otra población celular.

En el grupo con rinitis no detectamos correlación del CD23s ni de la IgE total sérica con ningún tipo de población celular.

4- CORRELACION DE LAS DISTINTAS POBLACIONES CD23+ ENTRE SI

Todos los subtipos celulares CD23+ contribuyeron, lógicamente, al total de población CD23+, pero lo hacía con una correlación más marcada la población de linfocitos B (B1+B6+), tanto en los asmáticos como en los pacientes con rinitis (en el caso de los asmáticos, por ejemplo, con una $R=0.9089$ y una $p<0.0001$) (fig. 25), cuestión además razonable si tenemos en cuenta que el porcentaje de estas células que expresa el receptor puede llegar en algunos casos a sobrepasar el 8% respecto a los linfocitos totales, mientras que en el caso de los linfocitos T sólo un paciente superó el 2% (tabla III).

Había correlación significativa en el grupo de pacientes asmáticos entre las poblaciones CD4+CD23+ y CD8+CD23+ ($R=0.7300$, $p<0.001$) (fig. 26). En el grupo de rinitis esta correlación sucedía con el número de receptores FcεRII/CD23 en la población CD8+CD23+ ($R=0.5911$, $p<0.05$) (fig. 27).

No hubo correlación entre las poblaciones CD23+ de linfocitos B y de los dos subtipos de linfocitos T estudiados.

Es de resaltar que el número de receptores CD23 no se correlacionó, en ningún subtipo celular, con el porcentaje de células que lo expresaban para el mismo subtipo. Es decir, el tener más porcentaje de células CD23+ no implicaba necesariamente

poseer también mayor densidad de receptores por célula (ej. fig. 28).

Por otra parte, en ningún caso la subpoblación B1-B6+ en conjunto, ni desglosada en los subtipos CD4+B6+ y CD8+B6+, influyó o se correlacionó con la población B1 total ni B1+B6-. El mismo resultado se obtuvo cuando se consideró la densidad o número de receptores.

5- INFLUENCIA DE LA EDAD Y DE LOS AÑOS DE EVOLUCION DE LA ENFERMEDAD EN LAS POBLACIONES FcεRII/CD23+

El porcentaje de linfocitos totales FcεRII/CD23+, así como el de las subpoblaciones B1+CD23+, CD4+CD23+ (fig. 29) y CD8+CD23+ no se modificó de forma apreciable con la edad en nuestro grupo de pacientes atópicos, cuyo rango de edad oscilaba entre 6 y 39 años. Ese porcentaje de células CD23+ se mantuvo constante en las diferentes edades.

El número de receptores CD23 por célula tampoco se vió influido por este parámetro en ninguna subpoblación.

Los valores séricos de la IgE y del CD23s tampoco experimentaron modificaciones dependientes de la edad en el rango estudiado, en ambos grupos de enfermos atópicos (rinitis y asma).

Sí existió correlación inversa y significativa entre la edad y la población B1 total ($R=-0.4268$, $p<0.05$) y más concretamente con la población B1+CD23- ($R=-0.4884$, $p<0.04$).

El tiempo de evolución de la enfermedad no influyó de forma determinante en las poblaciones CD23+ aunque de nuevo hubo correlación con la población B1+CD23- tanto en los pacientes con rinitis ($R=-0.5908$, $p<0.05$) como con asma ($R=-0.5558$, $p<0.01$).

TABLAS, FOTOGRAFÍAS Y FIGURAS

Tabla I PARAMETROS MEDIDOS Y RESULTADOS DEL ESTUDIO EN SUERO

PACIEN N	EDAD SEXO	Nº TC	CLINICA	GRADO	EVOL	IgE	CD23S	IgG4
Caso 1	12 V	1	R	2	6	136	111	486
Caso 2	28 H	6	R+A	2	3	601	421	486
Caso 3	25 V	7	R+A	2	7	644	358	333
Caso 4	14 V	2	R+A	2	8	2000	123	548
Caso 5	13 H	3	R	2	2	211	78	514
Caso 6	17 H	6	R	3	2	484	493	145
Caso 7	7 V	6	R	2	2	1554	352	557
Caso 8	8 H	4	R+A	2	2	2000	160	1080
Caso 9	18 H	3	R+A	2	1	2000	154	31
Caso 10	8 V	2	R+A	1	6	400	548	542
Caso 11	25 V	6	R	2	7	907	72	1170
Caso 12	6 V	3	R+A	3	2	2000	202	946
Caso 13	4 V	1	A	3	1	2000	223	66
Caso 14	12 V	2	R	2	2	251	61	357
Caso 15	16 V	2	R+A	2	3	145	537	193
Caso 16	20 H	2	R+A	2	8	640	46	542
Caso 17	29 V	3	R	2	2	46	215	407
Caso 18	12 V	3	A	2	10	577	486	382
Caso 19	12 V	2	R+A	2	7	772	203	34
Caso 20	11 V	2	A	3	4	290	69	818
Caso 21	21 H	12	R	2	10	174	166	36
Caso 22	17 H	5	R+A	2	5	283	213	571
Caso 23	33 V	2	R+A	2	13	326	573	459

PARAMETROS MEDIDOS Y RESULTADOS DEL ESTUDIO EN SUERO

PACIEN N	EDAD SEXO	Nº TC	CLINICA	GRADO	EVOL	IgE	CD23S	IgG4
Caso 24	17 H	7	R+A	2	2	577	74	223
Caso 25	42 H	5	R	1	3	26	113	1
Caso 26	30 H	4	R	2	3	54	57	1
Caso 27	7 V	3	A	1	2	208	221	677
Caso 28	34 H	2	A	3	15	2000	137	420
Caso 29	9 H	5	R+A	2	1	947	574	382
Caso 30	41 H	2	R	2	4	46	72	254
Caso 31	29 V	3	R+A	2	3	235	35	500
Caso 32	8 H	4	R	2	4	119	480	183
Caso 33	15 H	5	R	3	2	1063	64	333
Caso 34	33 V	4	R+A	1	20	131	899	500
Caso 35	33 V	1	R+A	1	15	70	35	557
Caso 36	20 V	3	R	2	2	335	82	486
Caso 37	5 V	1	R+A	2	2	732	100	154
Caso 38	3 H	3	R+A	2	2	394	509	154
Caso 39	11 V	1	R+A	1	1	154	88	364
Caso 40	20 H	4	R+A	2	1	197	301	820
Caso 41	22 H	1	R	2	2	158	774	163
Caso 42	19 V	4	R	3	3	816	121	646
Caso 43	20 H	11	R	3	2	40	106	243
Caso 44	21 H	1	R	2	2	332	362	528
Caso 45	25 V	1	R+A	2	2	105	67	900
Caso 46	18 V	2	R	2	8	624	74	265

PARAMETROS MEDIDOS Y RESULTADOS DEL ESTUDIO EN SUERO

PACIEN N	EDAD SEXO	Nº TC	CLINICA	GRADO	EVOL	IgE	CD23S	IgG4
Caso 47	13 V	3	DA	2	2	291	537	613
Caso 48	8 H	3	R+A	2	3	209	208	183
Caso 49	21 V	3	A	3	2	1902	145	646
Caso 50	13 V	3	R	3	4	937	960	710
Caso 51	15 V	2	R	2	1	728	178	118
Caso 52	19 H	4	R+A	2	7	52	120	243
Caso 53	16 V	3	R	2	8	1152	94	223
Caso 54	30 H	3	R	3	3	2000	960	470
Caso 55	22 H	2	R+A	2	7	744	142	85
Caso 56	9 H	3	R+A	2	1	466	290	85
Caso 57	4 H	2	R	2	4	541	284	710
Caso 58	23 V	3	R+A	2	3	243	45	631
Caso 59	17 V	8	R+A	2	7	1435	67	616
Caso 60	22 V	5	R+A	2	10	749	153	631
Caso 61	18 H	3	R	2	3	959	152	173
Caso 62	11 V	4	R+A	2	4	72	381	345
Caso 63	7 H	3	A	2	3	2000	102	860
Caso 64	12 H	8	R+A	2	3	1181	393	54
Caso 65	11 H	3	R	3	3	1811	310	500
Caso 66	7 V	5	R+A	1	2	409	960	693
Caso 67	13 V	2	R+A	2	2	709	128	173
Caso 68	59 H	6	R+A	2	5	38	36	203
Caso 69	11 V	9	R+A	2	1	450	502	710

PARAMETROS MEDIDOS Y RESULTADOS DEL ESTUDIO EN SUERO

PACIEN N	EDAD SEXO	Nº TC	CLINICA	GRADO	EVOL	IgE	CD23S	IgG4
Caso 70	22 H	4	R+A	2	1	2000	136	500
Caso 71	19 H	6	R	2	2	579	822	254
Caso 72	7 V	5	R+A	2	2	145	120	382
Caso 73	15 V	5	R+A	2	5	1603	102	1600
Caso 74	13 V	2	R+A	2	2	191	270	98
Caso 75	37 H	1	R+A	2	8	227	192	500
Caso 76	19 H	5	R+A	2	4	362	123	340
Caso 77	24 H	6	R+A	3	3	196	94	369
Caso 78	11 H	6	A	3	5	269	461	420
Caso 79	15 H	6	R+A	2	6	233	544	1000
Caso 80	48 H	2	R+A	2	5	133	35	662
Caso 81	10 V	5	A	1	1	225	79	74
Caso 82	18 V	7	R	2	10	160	42	1200
Caso 83	10 V	6	R+A	2	2	299	141	254
Caso 84	10 V	5	R+A	2	7	390	306	85
Caso 85	20 V	3	R	2	4	379	220	446
Caso 86	33 H	6	R+A	2	6	83	270	646
Caso 87	19 V	6	R+A	2	6	1115	960	528
Caso 88	42 H	--	A	2	5	29	39	26
Caso 89	8 H	5	R+A	2	2	1331	226	780
Caso 90	17 V	2	A	2	8	1349	480	725
Caso 91	7 V	7	R+A	2	3	540	201	154
Caso 92	29 H	4	R+A	1	7	343	363	394

PARAMETROS MEDIDOS Y RESULTADOS DEL ESTUDIO EN SUERO

PACIEN N	EDAD SEXO	Nº TC	CLINICA	GRADO	EVOL	IgE	CD23S	IgG4
Caso 93	12 V	5	R	2	3	1695	218	760
Caso 94	22 H	1	R+A	2	1	200	960	725
Caso 95	18 H	8	R+A	2	6	762	110	528
Caso 96	21 H	7	R+A	2	1	1510	490	127
Caso 97	9 H	--	A	3	1	46	262	154
Caso 98	23 V	3	R+A	2	7	773	107	514
Caso 99	6 V	10	R+A	2	4	90	216	47
Caso 100	22 H	2	R+A	2	10	300	58	1600
Caso 101	26 H	4	R	2	3	292	105	740
Caso 102	10 V	2	R	2	7	632	151	110
Caso 103	45 H	10	R+A	2	30	601	177	345
Caso 104	22 V	7	R+A	2	6	1251	110	662
Caso 105	13 H	5	R+A	2	6	92	78	357
Caso 106	23 V	2	R	2	6	149	495	357
Caso 107	33 H	3	R+A	2	3	228	960	114
Caso 108	23 V	2	R	2	5	184	55	26
Caso 109	23 V	4	R+A	2	5	163	78	183
Caso 110	4 V	2	R+A	2	2	676	344	459
Caso 111	29 H	5	R+A	3	2	874	246	277
Caso 112	20 H	4	R+A	2	4	489	222	646
Caso 113	37 H	5	R	2	2	1391	99	571
Caso 114	18 H	--	DA	3	3	208	58	500
Caso 115	22 H	--	DA+R	1	8	294	356	631

PARAMETROS MEDIDOS Y RESULTADOS DEL ESTUDIO EN SUERO

PACIEN N	EDAD SEXO	Nº TC	CLINICA	GRADO	EVOL	IgE	CD23S	IgG4
Caso 116	29 H	--	DA	2	9	114	94	820
Caso 117	29 V	6	DA+R+A	3	20	1226	147	500
Caso 118	16 H	6	DA+R	2	3	185	185	820
Caso 119	14 H	6	DA+R	2	13	429	562	254
Caso 120	22 H	1	DA+R	2	3	479	300	709
Caso 121	16 V	--	DA+R+A	2	15	150	134	82
Caso 122	63 V	3	A	3	1	43	85	420
Caso 123	16 H	2	R	2	6	182	475	118
Caso 124	14 H	2	R+A	2	3	446	134	77
Caso 125	16 H	2	R	2	2	86	960	407
Caso 126	39 H	2	R+A	3	1	114	78	193
Caso 127	27 V	8	R	2	10	258	46	127
Caso 128	27 V	8	R+A	2	10	1788	232	154
Caso 129	11 H	10	R+A	2	3	949	145	145
Caso 130	16 V	7	R+A	2	3	857	39	120
Caso 131	9 H	6	R+A	2	3	794	553	1250
Caso 132	9 H	4	R+A	2	4	303	216	110
Caso 133	37 V	7	R	2	10	208	84	223
Caso 134	15 V	4	R	2	2	1445	445	357
Caso 135	9 H	6	R	3	3	671	58	489
Caso 136	33 V	7	R+A	2	3	633	392	820
Caso 137	15 V	11	R	2	2	207	362	26
Caso 138	17 H	7	R+A	1	2	542	191	433

PARAMETROS MEDIDOS Y RESULTADOS DEL ESTUDIO EN SUERO

PACIEN N	EDAD SEXO	Nº TC	CLINICA	GRADO	EVOL	IgE	CD23S	IgG4
Caso 139	14 V	9	R+A	1	8	438	595	662
Caso 140	18 H	8	R+A	1	2	461	153	600
Caso 141	17 V	9	R+A	3	4	850	116	646
Caso 142	20 V	7	R	2	10	109	220	277
Caso 143	14 H	2	R+A	2	7	80	960	127
Caso 144	17 V	3	R+A	2	10	1097	143	850
Caso 145	39 H	11	R+A	2	20	487	80	54
Caso 146	12 H	3	A	2	3	248	248	127
Caso 147	21 H	2	R	2	3	2000	151	631
Caso 148	20 H	8	R	2	2	321	115	101
Caso 149	10 V	2	R+A	2	3	677	480	47
Caso 150	14 H	6	R+A	1	4	428	92	233
Caso 151	8 H	2	R+A	1	3	251	135	1050
Caso 152	9 H	2	A	3	3	972	617	600
Caso 153	14 V	2	A	2	10	394	108	693
Caso 154	17 V	2	R	2	8	76	189	433
Caso 155	13 V	4	R+A	3	3	607	299	528
Caso 156	42 V	2	A	3	7	242	82	213
Caso 157	10 V	2	R+A	2	8	252	165	890
Caso 158	26 H	4	R+A	2	2	750	95	571
Caso 159	21 V	4	R+A	2	3	362	179	357
Caso 160	8 V	2	R+A	1	3	561	126	500
Caso 161	17 V	5	R+A	2	10	974	99	93

PARAMETROS MEDIDOS Y RESULTADOS DEL ESTUDIO EN SUERO

PACIEN N	EDAD SEXO	Nº TC	CLINICA	GRADO	EVOL	IgE	CD23S I	G4
Caso 162	19 V	3	R	2	2	130	161	14
Caso 163	11 V	1	R+A	2	1	81	151	101
Caso 164	10 H	2	A	2	8	1300	120	557
Caso 165	10 V	2	R+A	2	9	587	326	677
Caso 166	12 V	4	R+A	1	4	170	675	223
Caso 167	17 H	1	R	2	5	375	153	741
Caso 168	26 V	4	R	2	3	74	122	1
Caso 169	17 H	8	R+A	1	1	255	58	...
Caso 170	22 H	8	R+A	2	11	714	128	...
Caso 171	24 V	2	R+A	2	3	1606	337	...
Caso 172	27 V	7	R+A	2	14	1502	51	...
Caso 173	11 V	2	R+A	1	3	1367	230	...
Caso 174	16 V	6	R	2	4	38	381	...
Caso 175	4 V	2	R+A	1	2	13	436	...
Caso 176	17 V	5	R+A	2	8	423	191	...
Caso 177	14 V	3	R+A	2	2	146	207	...
Caso 178	15 V	3	R+A	2	10	82	134	...
Caso 179	11 H	3	A	3	5	442	420	...
Caso 180	19 H	5	R	2	2	400	131	...
Caso 181	41 V	5	R+A	1	20	452	28	...
Caso 182	53 H	4	R+A	2	7	123	730	...
Caso 183	41 H	5	R+A	2	4	924	85	...
Caso 184	22 H	2	A	2	10	120	123	...

PARAMETROS MEDIDOS Y RESULTADOS DEL ESTUDIO EN SUERO

PACIEN N	EDAD SEXO	Nº TC	CLINICA	GRADO	EVOL	IgE	CD23S	IgG4
Caso 185	9 V	3	R+A	1	1	276	294	...
Caso 186	71 V	6	R+A	2	30	91	32	...
Caso 187	40 H	--	R+A	2	2	3	110	...
Caso 188	20 H	--	A	2	1	8	42	...
Caso 189	40 V	--	R+A	2	5	144	50	...
Caso 190	49 H	--	A	3	20	89	42	...
Caso 191	36 V	--	R	2	5	77	25	...
Caso 192	3 V	--	R+A	2	2	91	393	...
Caso 193	13 H	6	R+A	1	2	189	249	...
Caso 194	35 H	--	R+A	2	15	12	27	...
Caso 195	5 V	--	R+A	2	2	187	273	...
Caso 196	56 H	--	R+A	2	4	126	312	...
Caso 197	16 V	--	A	2	2	161	77	...
Caso 198	61 V	--	R+A	1	1	116	575	...
Caso 199	4 H	--	R+A	2	3	46	149	...
Caso 200	53 H	--	A	2	10	228	72	...
Caso 201	13 H	9	R+A	2	5	316	114	...
Caso 202	28 V	2	R	2	4	133	96	...
Caso 203	14 H	2	A	2	1	34	785	...
Caso 204	17 V	4	R+A	2	10	2	45	...
Caso 205	28 V	4	R+A	3	3	537	201	...
Caso 206	49 H	5	R+A	2	8	77	205	...
Caso 207	10 V	2	DA+A	2	4	184	417	...

PARAMETROS MEDIDOS Y RESULTADOS DEL ESTUDIO EN SUERO

PACIEN N	EDAD SEXO	Nº TC	CLINICA	GRADO	EVOL	IgE	CD23S	IgG4
Caso 208	18 H	5	R+A	2	10	311	90	...
Caso 209	8 H	2	R+A	1	1	500	127	...
Caso 210	13 V	1	R+A	1	1	319	83	...
Caso 211	16 H	--	R	2	1	194	67	...
Caso 212	28 H	5	R	3	6	269	18	...
Caso 213	38 H	3	R	2	9	100	33	...
Caso 214	25 V	4	R+A	3	4	55	324	...
Caso 215	16 H	6	R	2	10	793	52	...
Caso 216	10 V	5	R+A	3	3	1709	178	...
Caso 217	19 V	5	R	2	10	367	169	...
Caso 218	45 H	4	R+A	3	4	756	39	...
Caso 219	16 V	4	R	2	5	169	29	...
Caso 220	10 V	5	R+A	3	4	2000	92	...
Caso 221	36 H	4	R+A	2	5	104	22	...
Caso 222	32 H	7	R	2	7	68	50	...
Caso 223	27 H	3	R+A	3	4	289	209	...
Caso 224	16 H	4	R	3	3	519	217	...
Caso 225	20 H	4	R	2	11	127	960	...
Caso 226	12 H	5	R+A	2	4	200	66	...
Caso 227	15 V	--	R	3	3	100	40	...
Caso 228	26 H	--	R	1	2	50	183	...
Caso 229	14 H	--	R	2	1	120	50	...
Caso 230	30 V	--	R	2	2	161	33	...

PARAMETROS MEDIDOS Y RESULTADOS DEL ESTUDIO EN SUERO

PACIEN N	EDAD SEXO	Nº TC	CLINICA	GRADO	EVOL	IgE	CD23S	IgG4
Caso 231	28 V	--	R	1	8	220	79	...
Caso 232	34 H	--	R	3	5	110	19	...
Caso 233	17 H	--	R	1	1	40	117	...
Caso 234	29 V	--	R	2	8	250	73	...
Caso 235	30 V	--	R	2	3	90	22	...
Caso 236	20 H	--	R	1	2	100	241	...
Caso 237	35 H	--	A	2	8	56	230	...
Caso 238	30 V	--	A	3	3	200	162	...
Caso 239	38 H	--	A	2	6	100	111	...
Caso 240	35 H	--	A	1	1	90	68	...
Caso 241	20 V	--	A	1	1	120	90	...
Caso 242	39 V	--	A	3	4	150	108	...
Caso 243	29 H	--	A	2	2	90	45	...
Caso 244	18 H	--	A	1	2	45	102	...
Caso 245	40 V	--	A	3	3	130	54	...
Caso 246	30 V	--	A	2	2	100	55	...
Caso 247	30 V	--	R+A	2	4	56	91	...
Caso 248	24 H	--	R+A	1	1	110	109	...
Caso 249	29 H	--	R+A	2	5	99	117	...
Caso 250	38 V	--	R+A	2	4	100	29	...
Caso 251	34 V	--	R+A	3	3	110	57	...
Caso 252	20 H	--	R+A	2	2	45	42	...
Caso 253	31 V	--	R+A	2	2	90	65	...

PARAMETROS MEDIDOS Y RESULTADOS DEL ESTUDIO EN SUERO

PACIEN N	EDAD SEXO	Nº TC	CLINICA	GRADO	EVOL	IgE	CD23S	IgG4
Caso 254	33 V	--	R+A	2	3	99	61	...

H Hembra; V= Varón; TC= test cutáneos
 --= test cutáneos negativos
 R= Rinitis; R+A= rinitis más asma
 A= Asma; DA= Dermatitis atópica
 EVOL= años de evolución

TABLA II

PARAMETROS Y POBLACIONES CELULARES RELACIONADAS

EDAD
AÑOS DE EVOLUCION
IgE TOTAL
CD23 SOLUBLE
POBLACION B1 TOTAL
POBLACION B1+B6-
POBLACION B1+B6+
POBLACION B6+B1-
POBLACION B6 TOTAL
POBLACION CD4+B6+
POBLACION CD8+B6+
NUMERO DE RECEPTORES B6 EN POBLACION B6 TOTAL
NUMERO DE RECEPTORES B6 EN POBLACION B6+B1-
NUMERO DE RECEPTORES B6 EN POBLACION CD4+B6+
NUMERO DE RECEPTORES B6 EN POBLACION CD8+B6+

TABLA IIIa

RESULTADOS DE LA IgE, CD23s Y PORCENTAJE DE LINFOCITOS B, CD4 Y CD8 CD23+ RESPECTO A LOS LINFOCITOS TOTALES. EDAD Y AÑOS DE EVOLUCION

A) GRUPO DE RINITIS (N=11)

P	ED	AE	IgE	CD23s	B1B6	CD4B6	CD8B6
1...	23	6	81	179	3.40	0.60	0.60
2...	20	10	679	176	3.90	0.40	0.20
3...	15	6	83	218	2.80	0.30	0.20
4...	17	8	21	100	5.60	0.30	0.40
5...	19	2	38	93	6.50	0.40	0.40
6...	17	1	83	78	3.90	1.80	1.40
7...	20	2	103	244	6.00	1.90	0.60
8...	15	3	107	98	7.10	0.50	2.40
9...	13	2	189	178	4.20	0.70	0.60
10...	28	4	12	62	4.60	1.40	0.50
11...	15	1	17	428	7.50	0.70	0.30

P= paciente

ED= edad; AE= años de evolución

B1B6= % de células B CD23+/linfocitos totales

CD4B6= % de células CD4 CD23+/linfocitos totales

CD8B6= % de células CD8 CD23+/linfocitos totales

TABLA IIIb

**RESULTADOS DE LA IgE, CD23s Y PORCENTAJE DE
LINFOCITOS B, CD4 Y CD8 CD23+ RESPECTO A LOS
LINFOCITOS TOTALES. EDAD Y AÑOS DE EVOLUCION**

B) GRUPO DE ASMATICOS (N=18)

P	ED	AE	IgE	CD23s	B1B6	CD4B6	CD8B6
1...	39	10	129	84	4.10	0.50	0.20
2...	14	7	50	397	1.90	0.60	0.20
3...	14	4	34	86	2.40	0.40	0.20
4...	10	9	279	150	6.30	0.10	0.40
5...	8	3	228	150	6.40	0.40	0.20
6...	14	4	207	69	3.00	0.60	0.30
7...	8	3	170	175	2.70	0.50	0.20
8...	26	2	210	74	4.20	0.60	0.50
9...	17	10	276	67	3.50	1.40	1.40
10...	12	4	107	394	6.10	1.10	0.70
11...	14	2	133	161	4.50	1.50	1.50
12...	15	10	26	100	5.30	1.10	2.00
13...	13	1	148	60	8.40	0.60	0.50
14...	14	1	46	703	6.00	0.30	0.30
15...	6	2	94	247	5.60	0.40	0.20
16...	17	10	318	46	5.50	0.80	0.70
17...	22	7	117	118	2.80	1.20	1.40
18...	14	10	344	92	7.00	0.70	0.70

P= paciente

ED=edad; AE=años de evolución

B1B6= % de células B CD23+/linfocitos totales

CD4B6= % de células CD4 CD23+/linfocitos totales

CD8B6= % de células CD8 CD23+/linfocitos totales

TABLA IV
PORCENTAJE DE LINFOCITOS TOTALES CD23+

RINITIS	ASMA	CONTROLES
Caso 1.....4.30	Caso 1.....5.60	Caso 1.....9.40
2.....7.10	2.....4.20	2.....7.80
3.....4.90	3.....4.60	3.....4.60
4.....6.80	4.....7.40	4.....2.90
5.....7.00	5.....7.20	5.....5.90
6.....6.90	6.....4.00	6.....6.20
7.....8.90	7.....3.30	7.....5.20
8.....8.40	8.....4.90	8.....10.20
9.....4.90	9.....5.10	9.....5.20
10.....5.70	10.....7.90	10.....9.40
11.....8.50	11.....7.20	11.....5.30
	12.....7.70	12.....3.60
	13.....10.10	13.....7.10
	14.....6.90	14.....4.80
	15.....6.30	15.....8.50
	16.....8.80	
	17.....5.20	
	18.....8.60	

TABLA Va

NUMERO DE RECEPTORES CD23 POR CELULA

A) GRUPO DE RINITIS

	<u>B6total</u>	<u>CD4B6</u>	<u>CD8B6</u>
Paciente 1.....	31000	13000	26000
2.....	27000	32100	32400
3.....	18000	31300	44200
4.....	22000	29000	21900
5.....	35000	22000	31990
6.....	29300	31200	41600
7.....	30160	31960	66000
8.....	44920	35000	19000
9.....	38000	30500	26500
10.....	39700	27000	24900
11.....	26700	26700	34000

(cifras en miles)

TABLA Vb

NUMERO DE RECEPTORES POR CELULA

B) GRUPO DE ASMATICOS

	<u>B6total</u>	<u>CD4B6</u>	<u>CD8B6</u>
Paciente 1.....	27300	13900	63000
2.....	19000	30200	36000
3.....	22000	28000	42000
4.....	26500	25100	16880
5.....	18500	20000	28200
6.....	26000	24000	23900
7.....	24900	19000	29000
8.....	40000	21000	18000
9.....	31000	37000	11000
10.....	26500	36200	35900
11.....	27000	38000	39500
12.....	24200	31500	34000
13.....	32500	27900	33900
14.....	28200	41300	47000
15.....	31960	32230	32390
16.....	34200	26500	26700
17.....	30600	23500	23600
18.....	34100	29730	29210

(cifras en miles)

TABLA Vc

NUMERO DE RECEPTORES POR CELULA

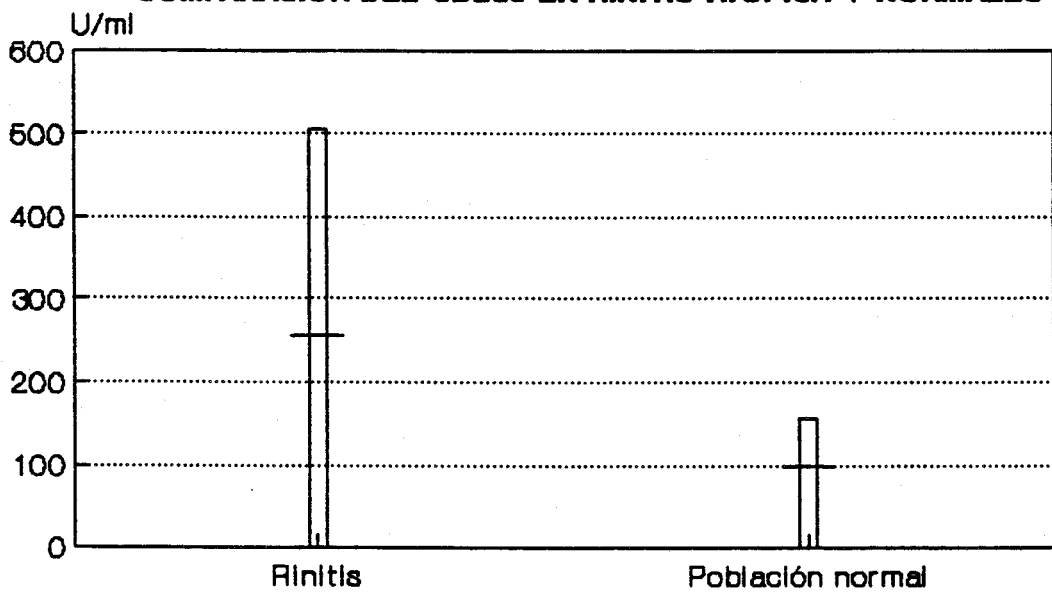
C) GRUPO CONTROL

	<u>B6total</u>	<u>CD4B6</u>	<u>CD8B6</u>
Paciente 1.....	47200	25600	28000
2.....	34300	29970	37700
3.....	31200	29000	26500
4.....	29500	40000	28000
5.....	31000	30000	23340
6.....	31000	23000	14500
7.....	28000	37000	16990
8.....	31500	31300	22890
9.....	18700	15000	11400
10.....	22890	22000	14000
11.....	23000	11427	16500
12.....	16910	11200	14000
13.....	19760	12000	11710
14.....	17300	12400	15500
15.....	26000	12000	20000



FIGURA 1

COMPARACION DEL CD23s EN RINITIS ATOPICA Y NORMALES

 $p < 0.0001$

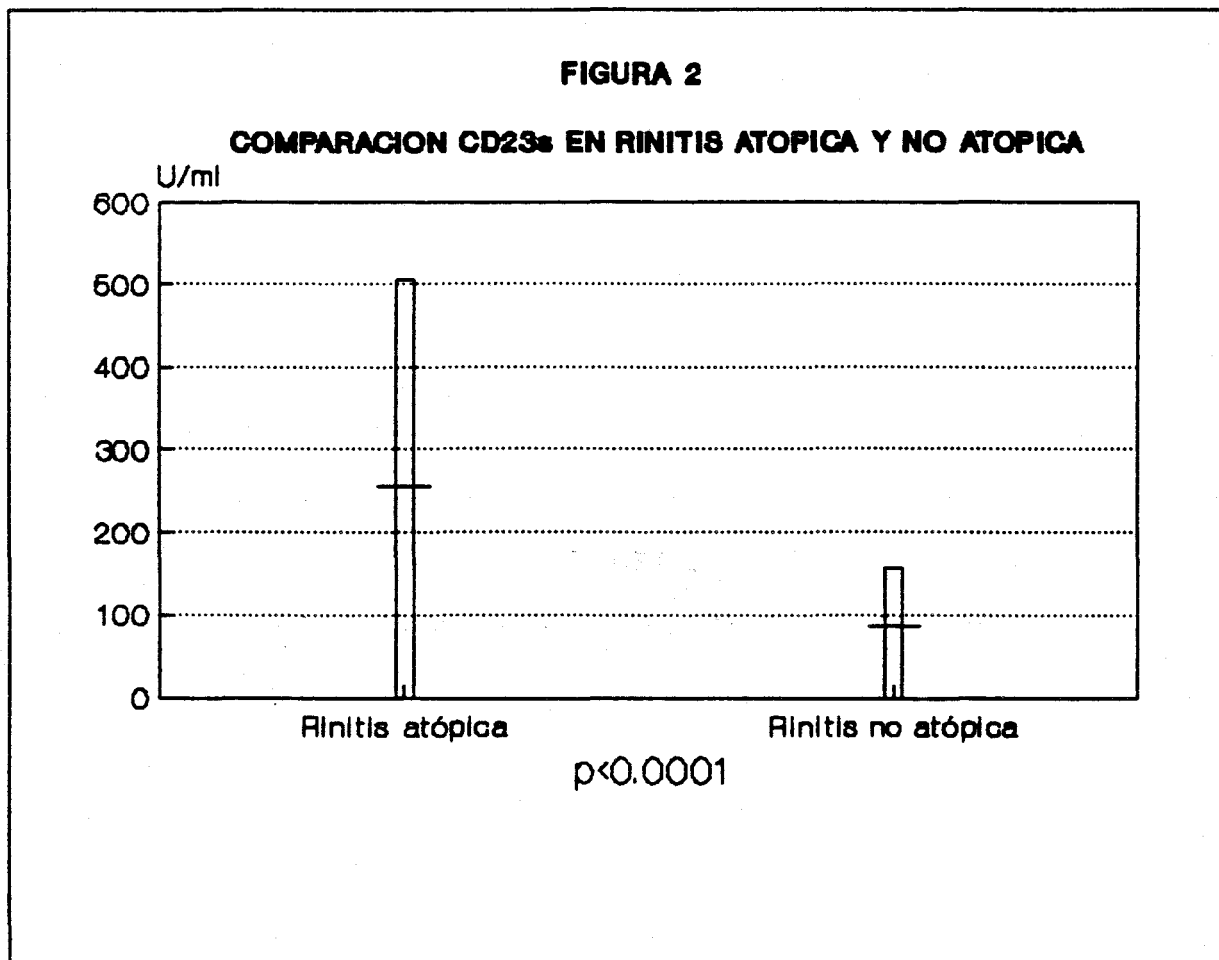


FIGURA 3

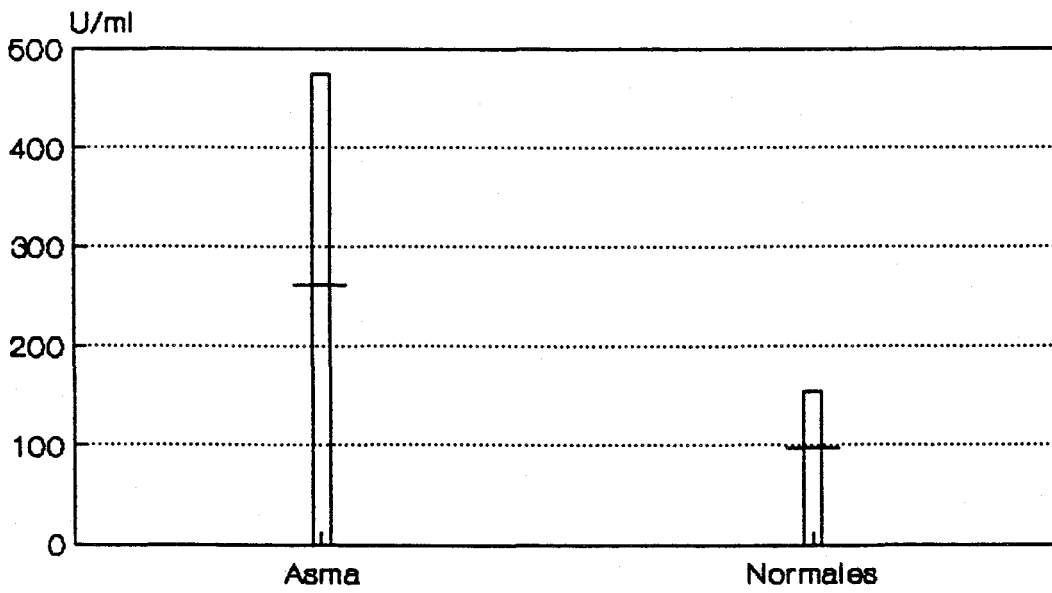
COMPARACION DEL CD23_e EN ASMA ATOPICO Y NORMALES $p < 0.0003$

FIGURA 4

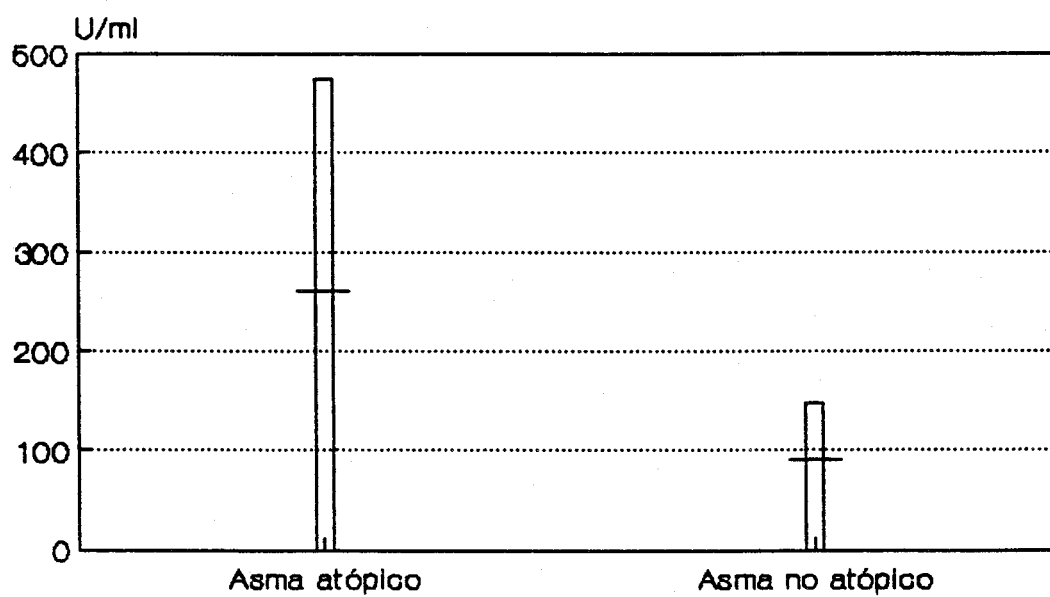
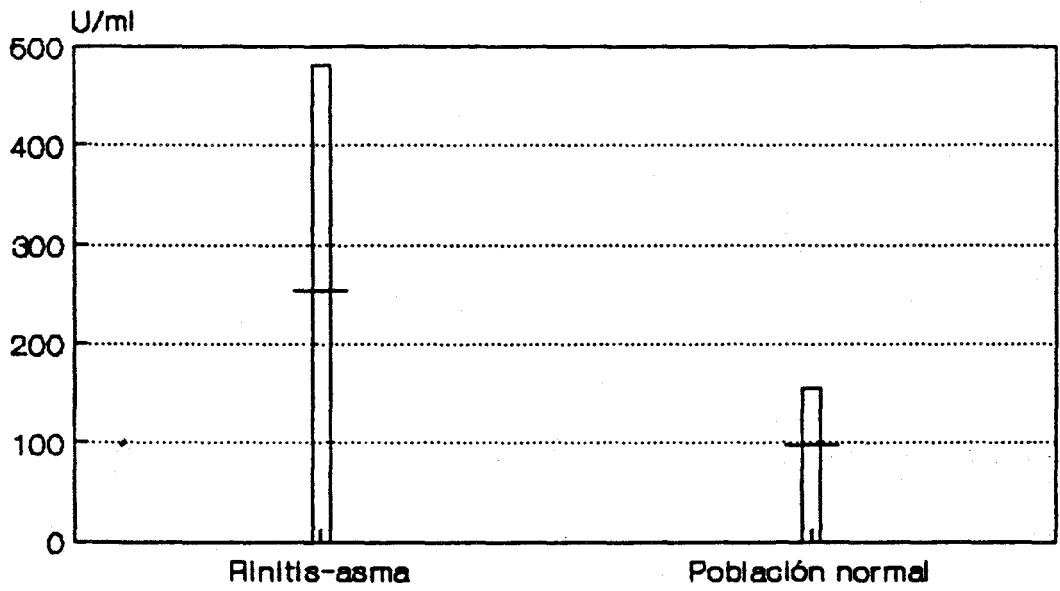
COMPARACION DEL CD23_s EN ASMA ATOPICA Y NO ATOPICA $p < 0.0004$

FIGURA 5

COMPARACION CD23_e EN RINITIS Y ASMA ATOPICOS CON CONTROLES



$p < 0.0001$

FIGURA 6

COMPARACION CD238 EN RINITIS Y ASMA ATOPICOS Y NO ATOPICOS

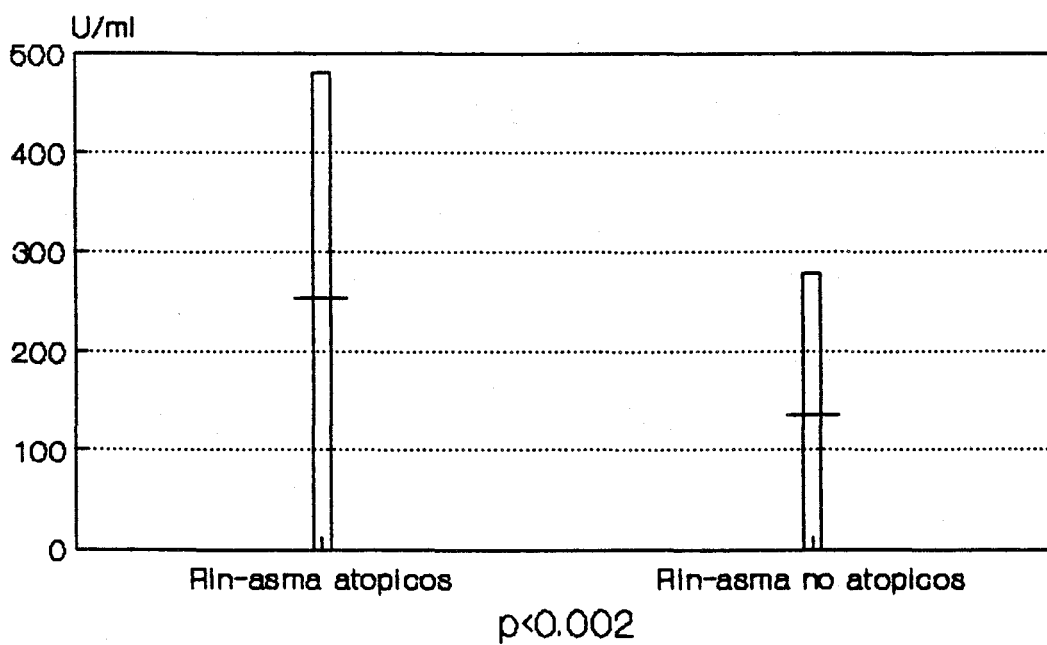


FIGURA 7

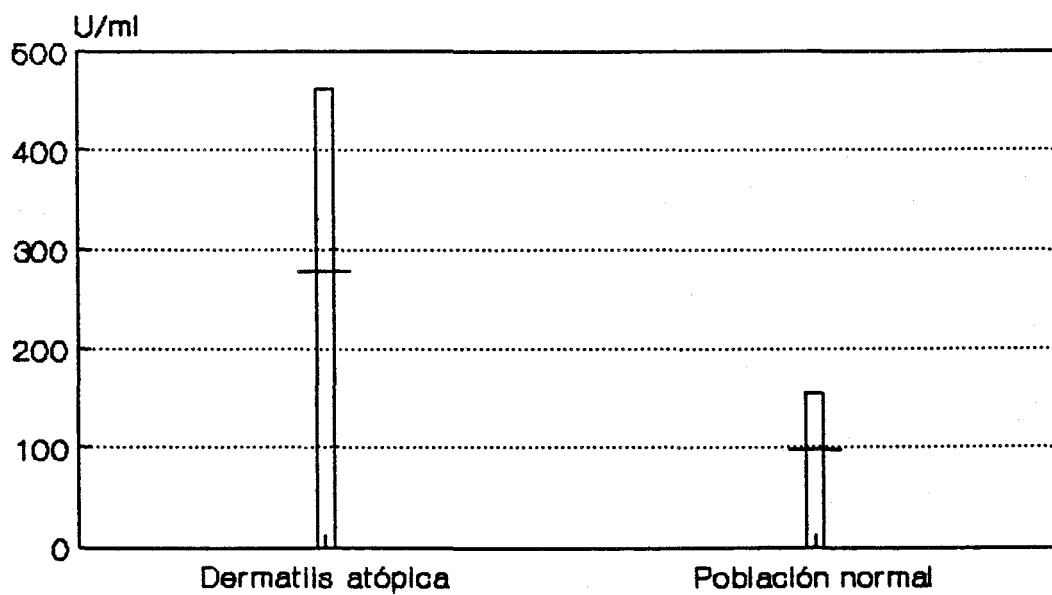
COMPARACION DEL CD23_s EN DERMATITIS ATOPICA Y NORMALES $p < 0.001$

FIGURA 8

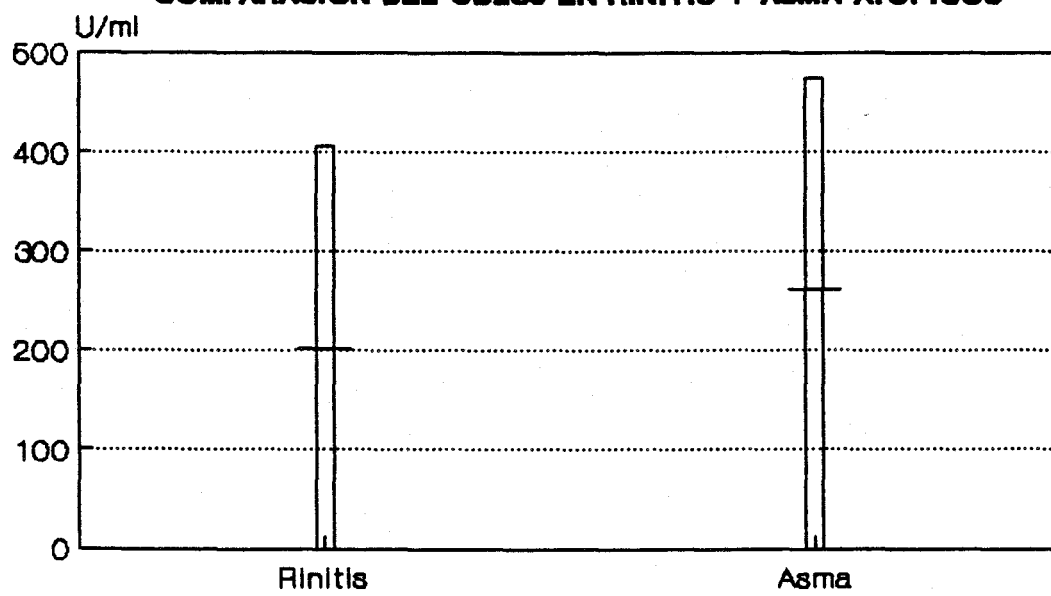
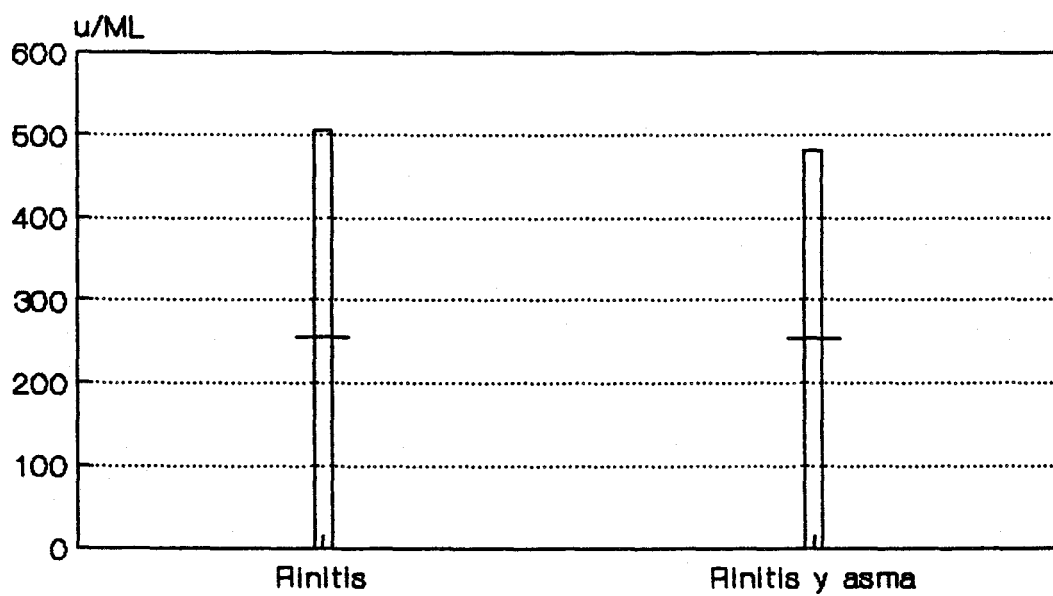
COMPARACION DEL CD23_s EN RINITIS Y ASMA ATOPICOS $p < 0.05$

FIGURA 9

COMPARACION CD23_e EN RINITIS CON ASMA MAS RINITIS ATOPICOS

N.S.

FIGURA 10

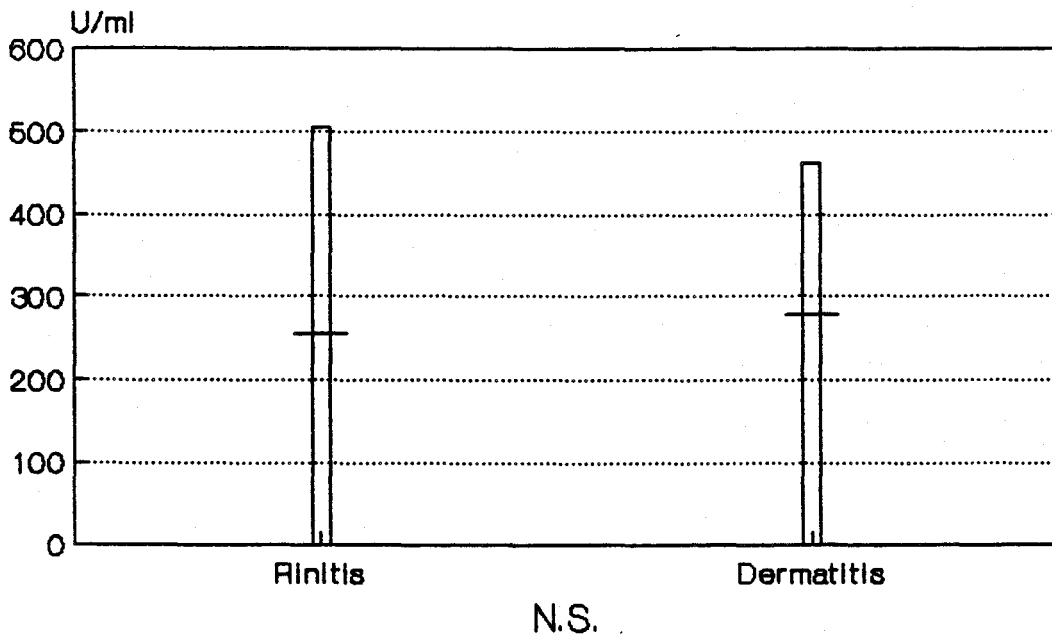
COMPARACION DEL CD23_s EN RINITIS Y DERMATITIS ATOPICAS

FIGURA 11

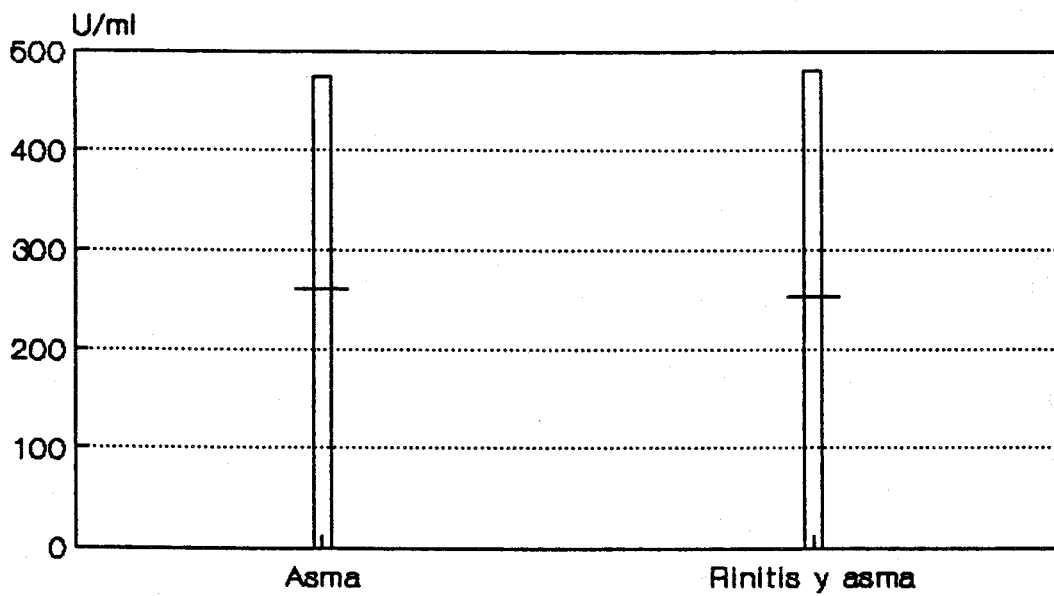
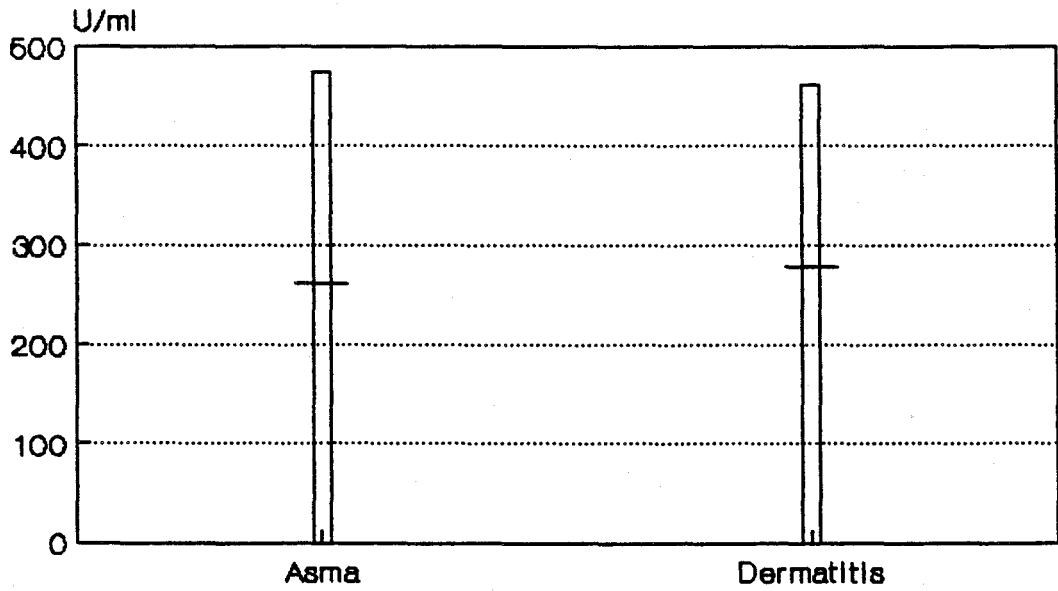
COMPARACION DEL CD23_s EN ASMA CON RINITIS MAS ASMA ATOPICOS

FIGURA 12

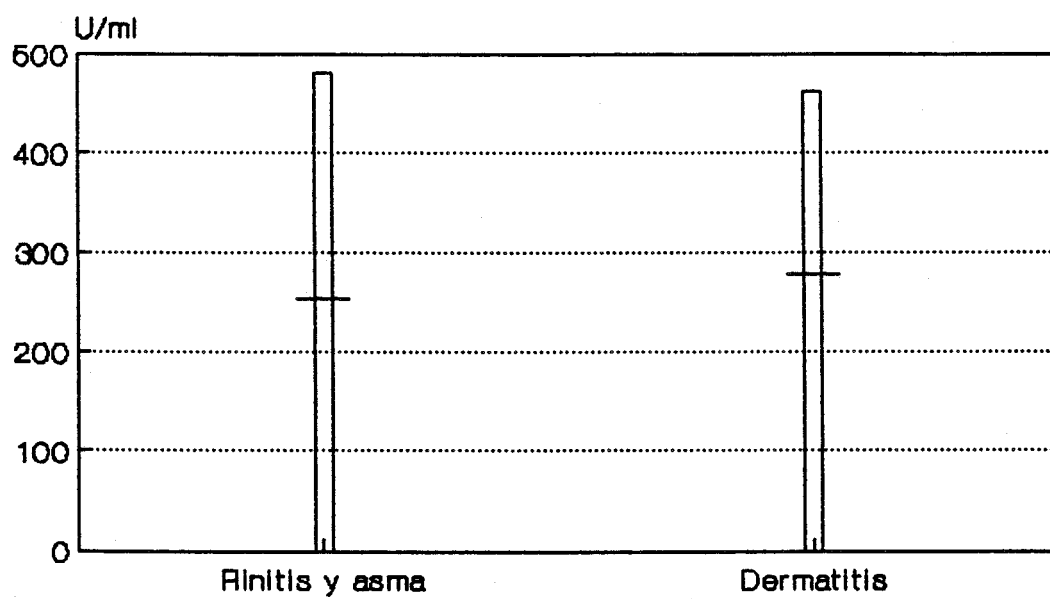
COMPARACION DEL CD23s EN ASMA Y DERMATITIS ATOPICA



N.S.

FIGURA 13

COMPARACION CD23s EN RINITIS Y ASMA CON DERMATITIS ATOPICA



N.S.

Figura 14

CORRELACION ENTRE EL CD23 SOLUBLE Y LA IgE TOTAL EN ASMATICOS
(no significativa)

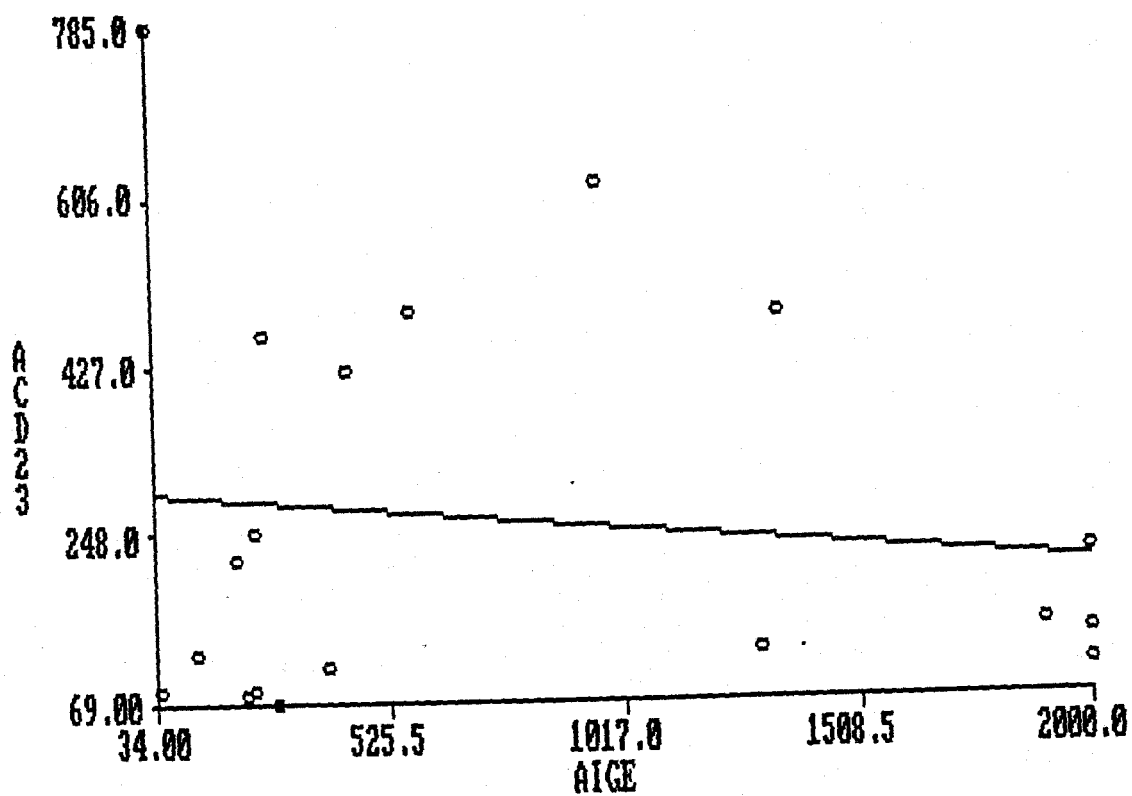


FIGURA 16

COMPARACION DEL CD29 EN LIFOCITOS TOTALES

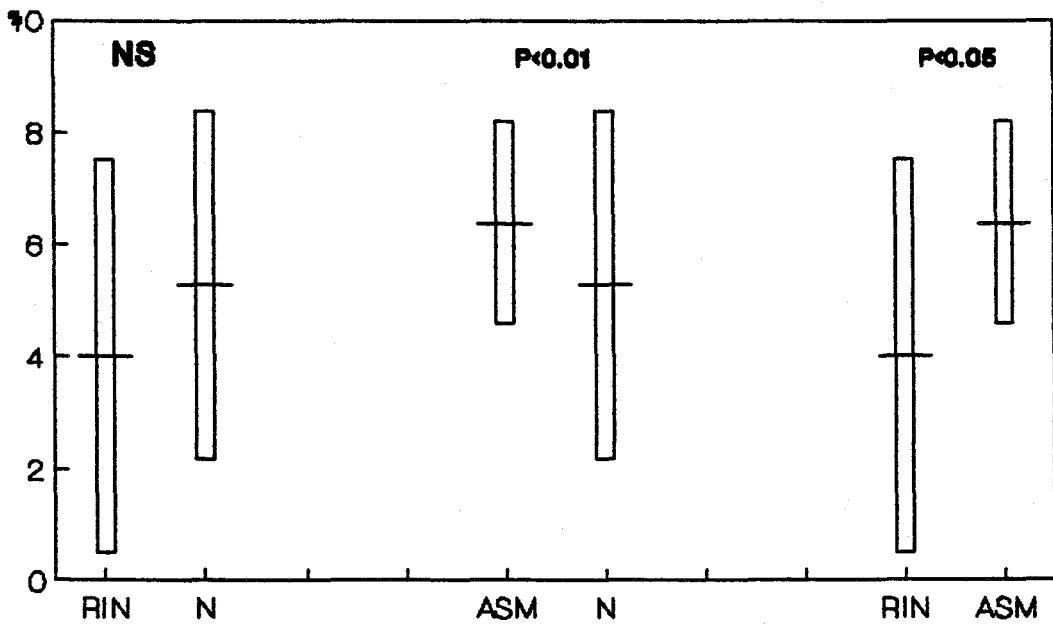


FIGURA 16

NUMERO DE RECEPTORES CD23 EN LINFOCITOS TOTALES

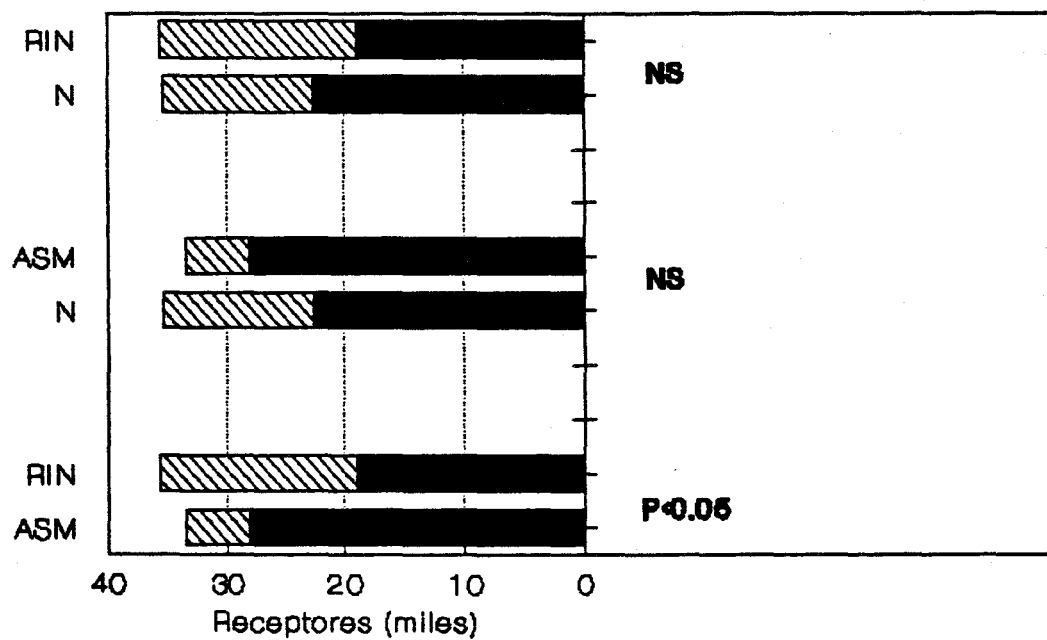


FIGURA 17

COMPARACION EN % DEL CD23 EN LINFOCITOS B

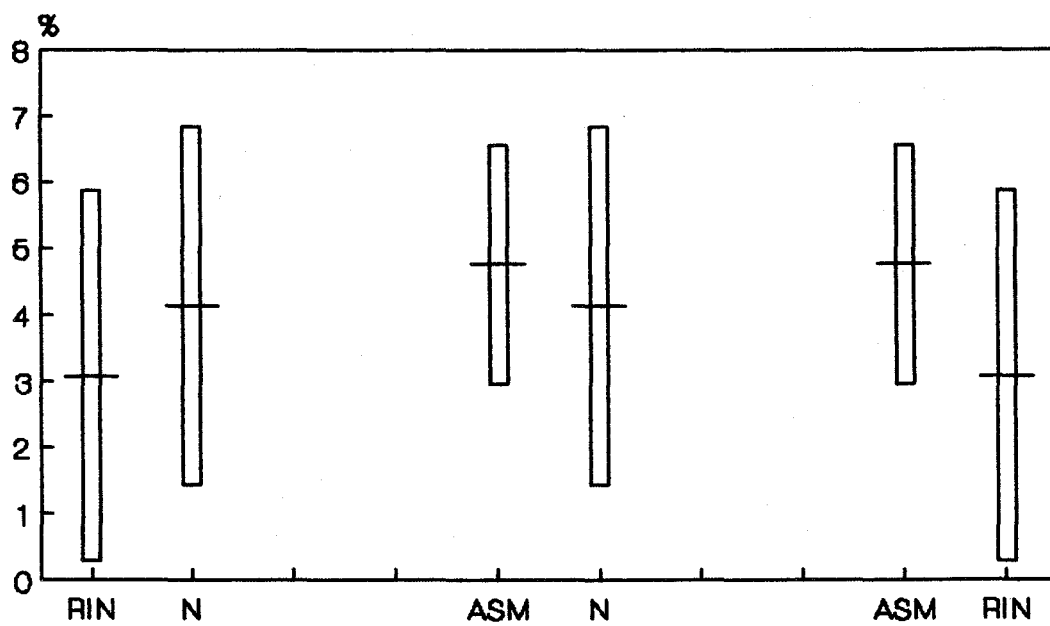


FIGURA 18

COMPARACION EN % DEL CD23 EN LINFOCITOS CD4

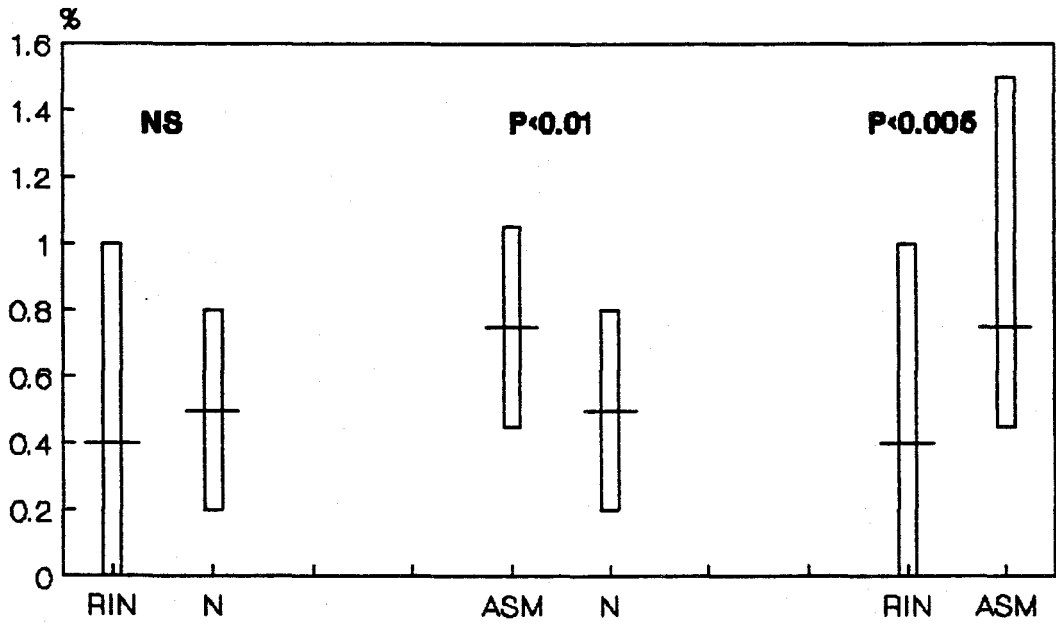


FIGURA 19

NUMERO DE RECEPTORES CD23 EN LINFOCITOS CD4

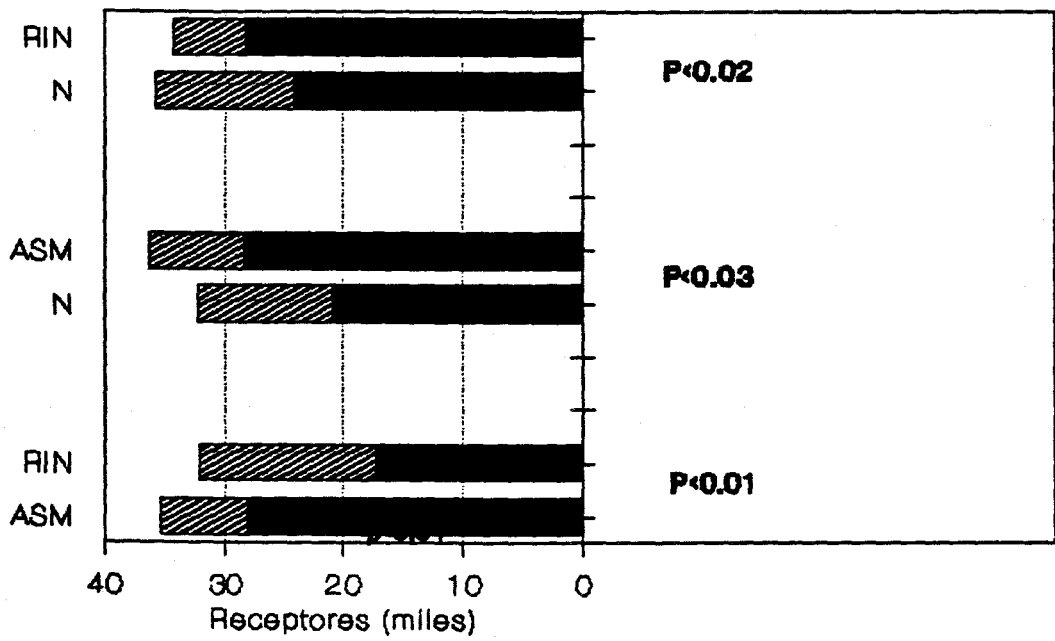


FIGURA 20

COMPARACION EN % DEL CD23 EN LINFOCITOS CD8

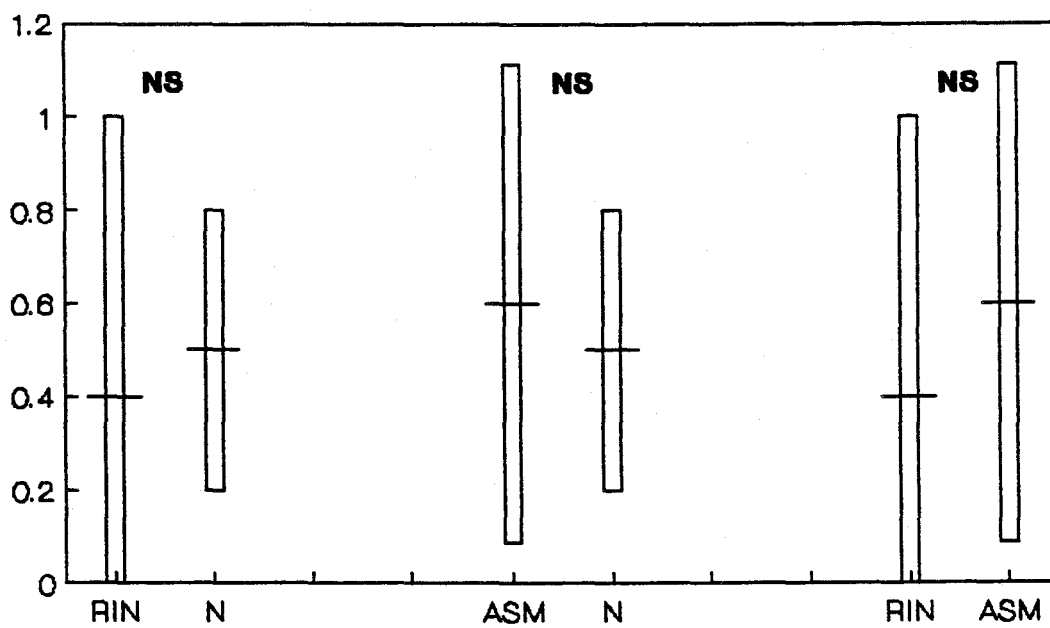


FIGURA 21

NUMERO DE RECEPTORES CD23 EN LINFOCITOS CD8

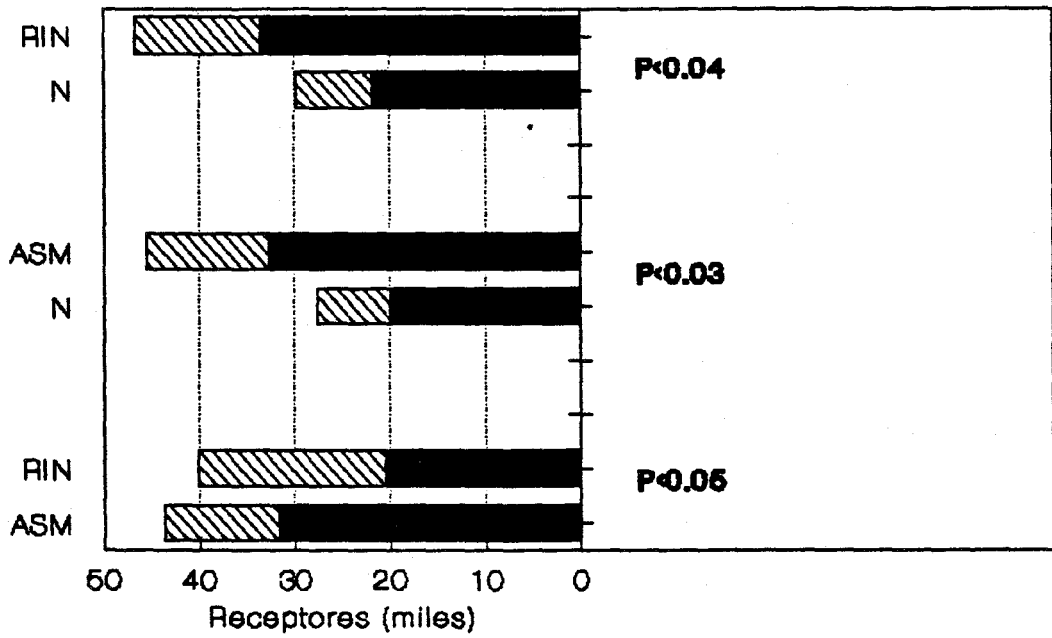


FIGURA 22

CORRELACION DEL CD23s EN ASMATICOS CON EL NUMERO DE RECEPTORES
EN CELULAS CD4

($r=0.5413$; $p<0.002$)

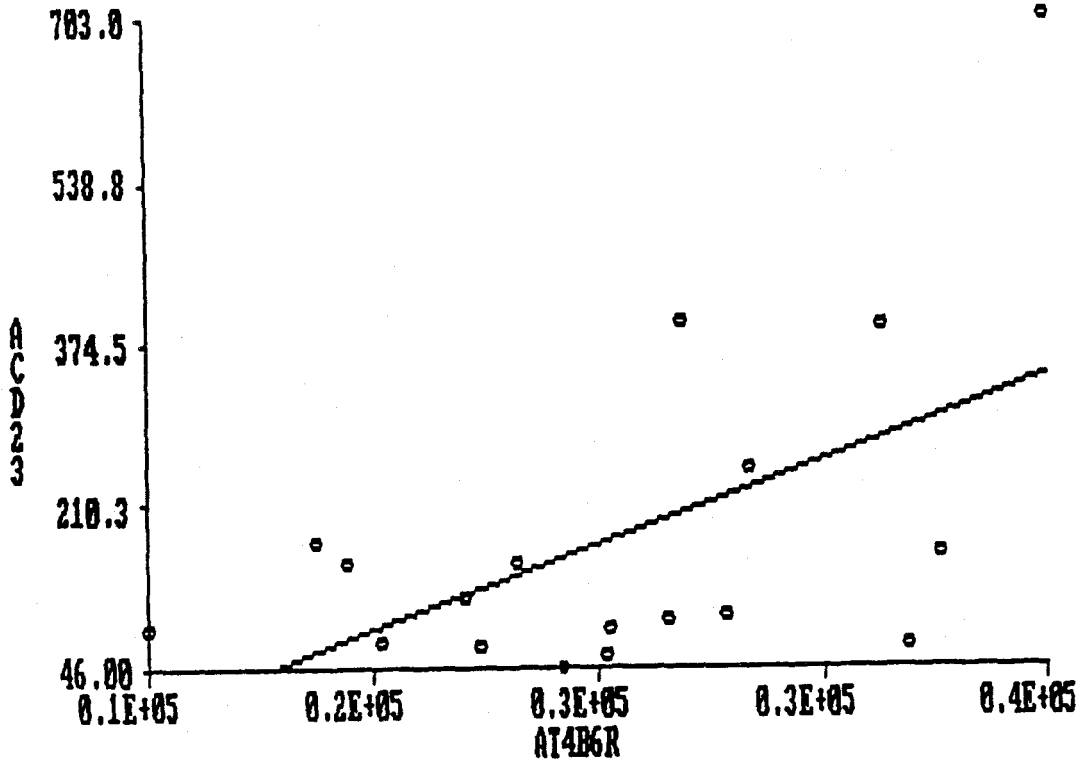


FIGURA 23

CORRELACION DEL CD23s CON LA POBLACION B1+CD23+
(no significativa)

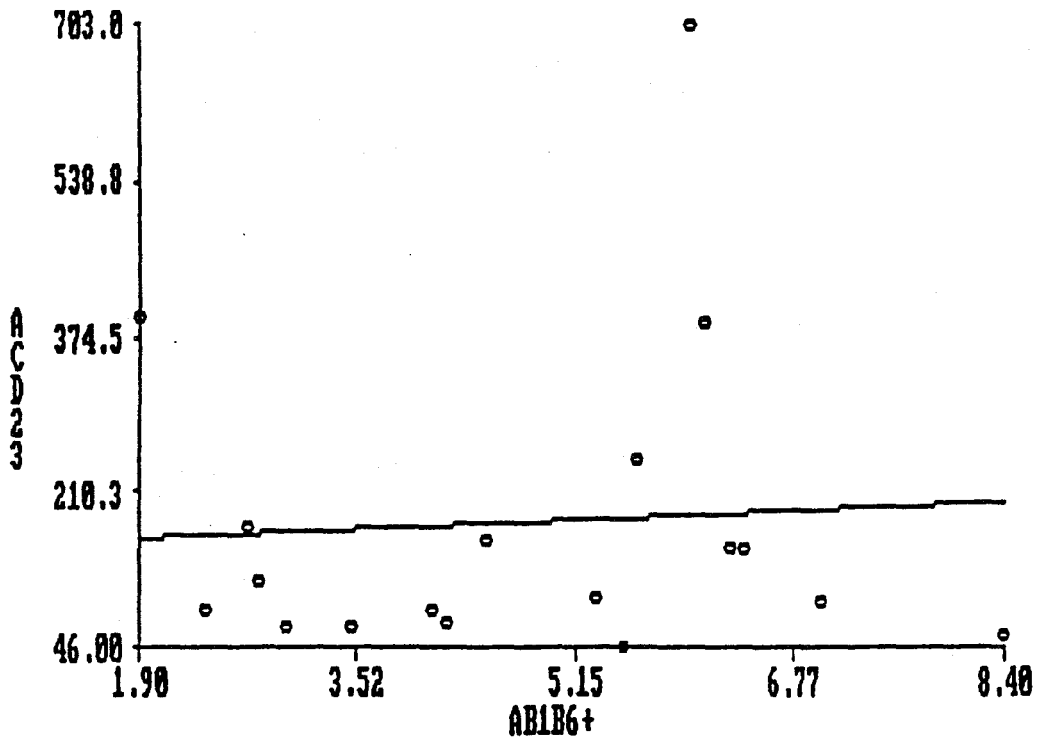


FIGURA 24

CORRELACION DE LA IgE CON EL NUMERO DE RECEPTORES CD23 EN
LINFOCITOS CD4

($r=-0.5810$; $p<0.01$)

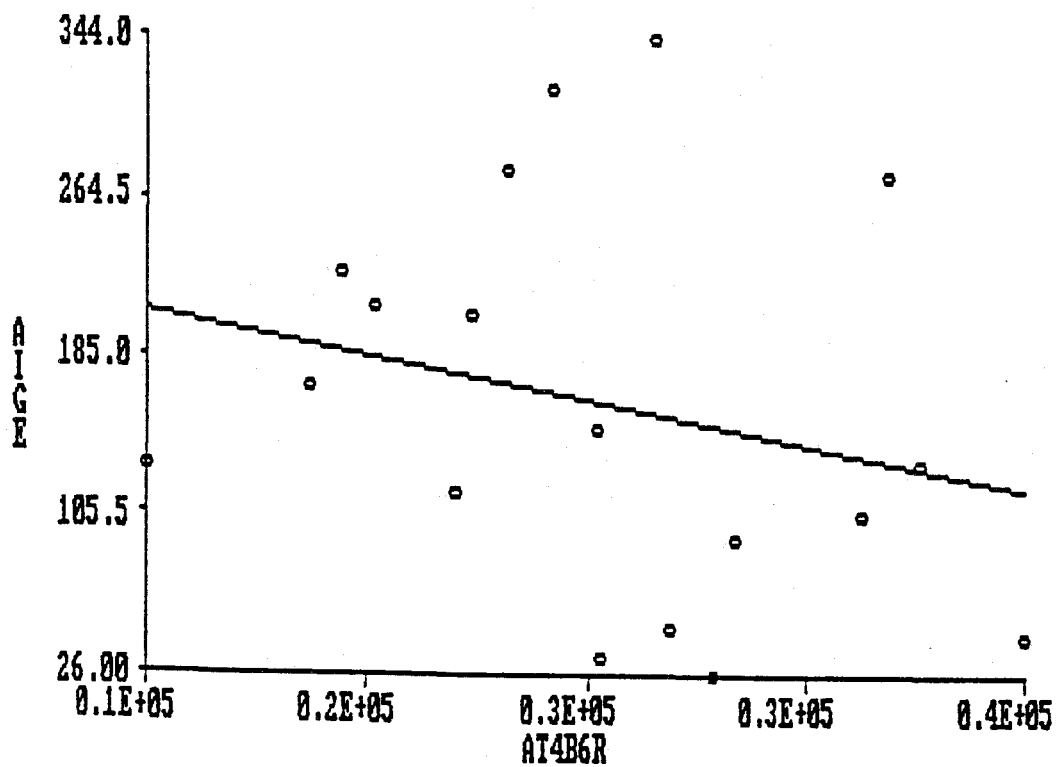


FIGURA 25

CORRELACION DE LA POBLACION BI+B6+ CON LA POBLACION B6 TOTAL EN
ASMATICOS

($r=0.9089$; $p<0001$)

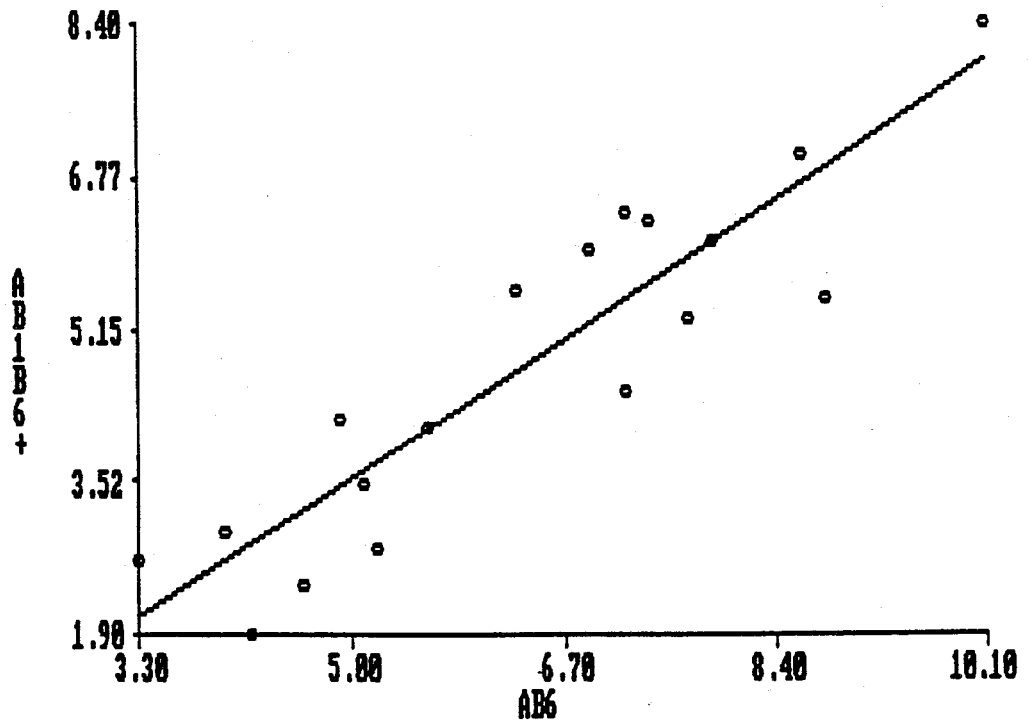


FIGURA 26

CORRELACION EN ASMATICOS ENTRE LAS POBLACIONES CD4+CD23+ Y

CD8+CD23+

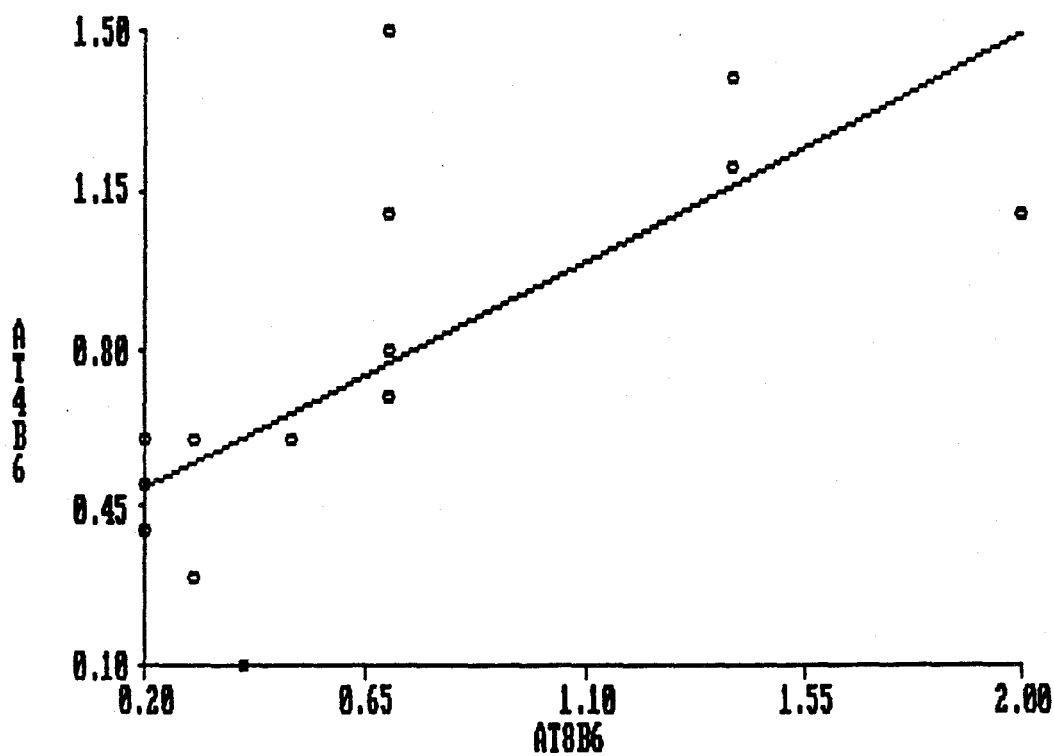
 $(r=0.7300; p<0.001)$ 

FIGURA 27

CORRELACION EN LA RINITIS ENTRE LA POBLACION CD4+CD23+ Y EL
NUMERO DE RECEPTORES EN LINFOCITOS CD8+

($r=0.5911$; $p<0.05$)

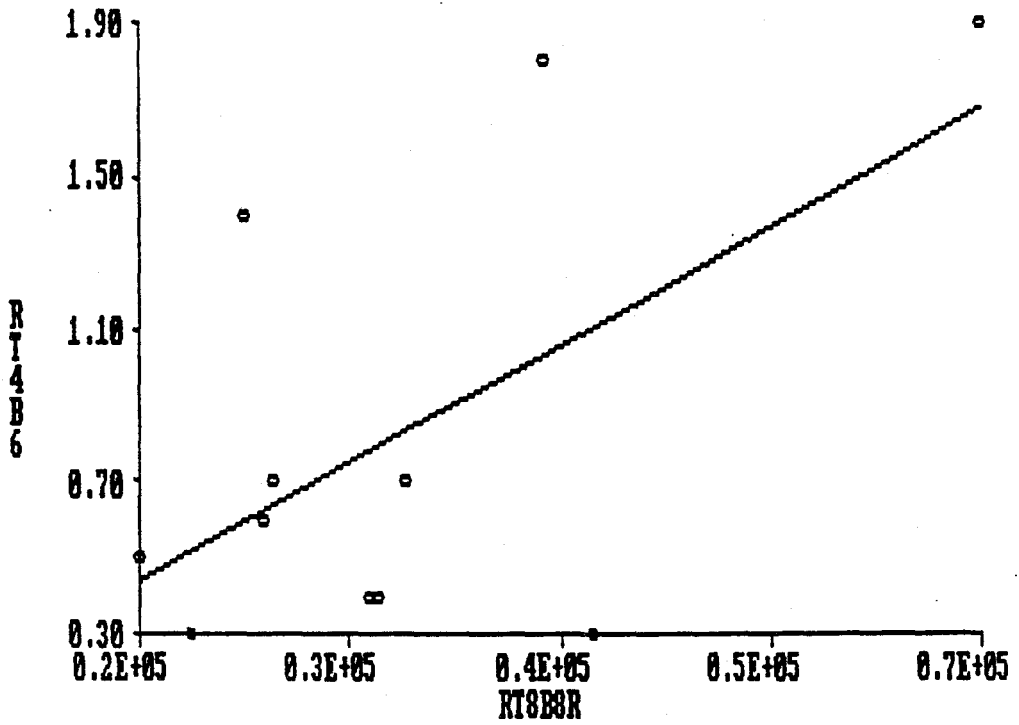


FIGURA 28

CORRELACION ENTRE LA POBLACION CD4+CD23+ Y EL NUMERO DE RECEPTORES CD23 EN ESAS MISMAS CELULAS
(no significativa)

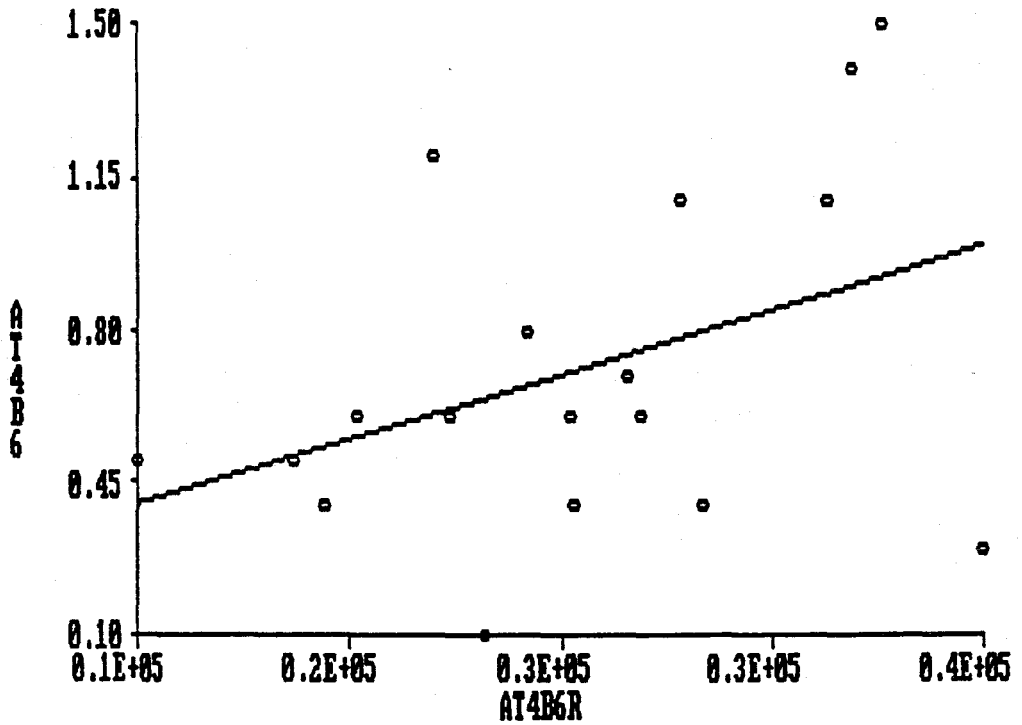
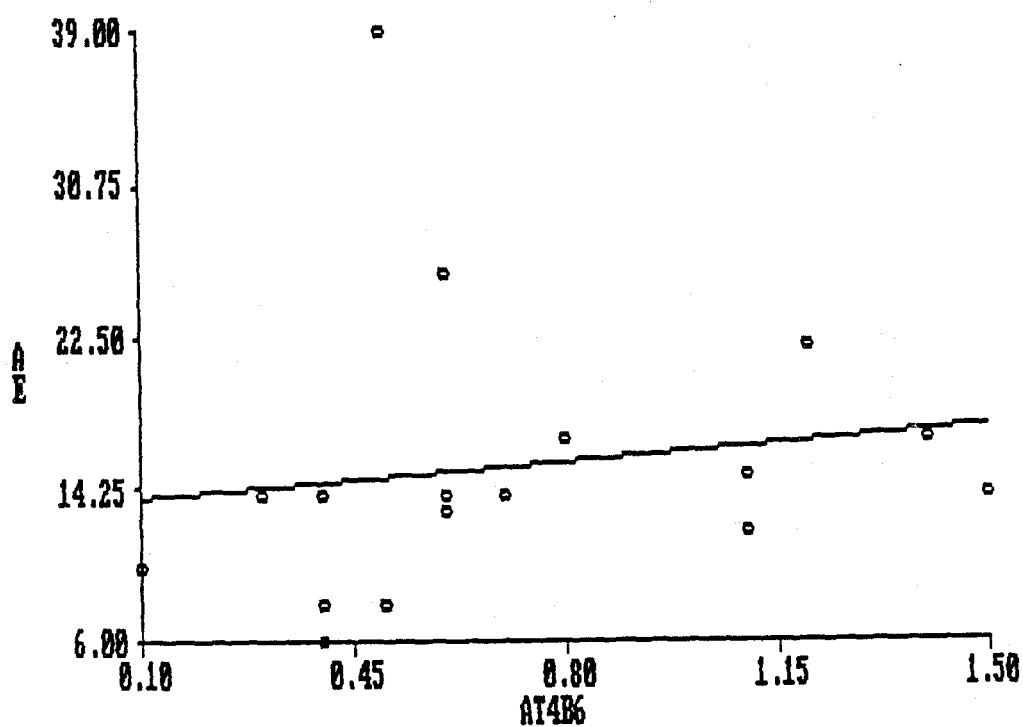


FIGURA 29

CORRELACION DE LA EDAD EN LOS ASMATICOS CON LA POBLACION

CD4+CD23+

(no significativa)



CAPITULO IV:

DISCUSION

DISCUSION

A- ESTUDIO EN SUERO

1.- Niveles de CD23s y su papel en la regulación de la IgE

El presente estudio se inició siguiendo las observaciones "in vitro" de algunos autores (4) (123) sobre el posible papel del CD23s en la regulación (sobrerregulación) de la síntesis de la IgE.

¿Existe relación causal entre el CD23s y la producción de IgE?

Los resultados obtenidos indican que los sujetos alérgicos tienen niveles séricos significativamente más altos de CD23s que los controles sanos, a pesar de haber encontrado una variabilidad importante entre los distintos pacientes. Es de resaltar, que esto sucedió en todos los grupos de atópicos, rinitis, asma y dermatitis atópica.

Sin embargo, no observamos correlación con los niveles de IgE sérica, es decir, los sujetos alérgicos con IgE elevada no tienen por qué tener elevado también el CD23s, y viceversa.

Algunos autores japoneses (90) han encontrado asociación

directa entre la IgE sérica y el CD23s pero con una correlación demasiado débil ($R= 0.16$) como para extraer conclusiones. En otro trabajo en niños (91), la correlación tendía más a ser negativa que positiva, pero también pobremente. En algún estudio, la asociación directa sólo se encontró en los pacientes con los niveles más altos de IgE (133).

Nosotros hemos encontrado pacientes con niveles muy altos de IgE sérica y a la vez bajos de CD23s, y lo mismo al contrario. Estos resultados no hablan a favor de una relación causal entre la producción incrementada de CD23s y la de IgE; no podemos afirmar que el CD23s tenga un papel potenciador de la síntesis de IgE. Es posible que la elevación del CD23s en atópicos refleje otra anomalía de su respuesta inmune sin que esté relacionada directamente con la producción aberrante de IgE. Ya comentamos en la introducción la variedad de diferentes funciones que puede representar esta molécula.

Algunos estudios "in vitro" también están en consonancia con nuestros resultados. Autores como Sarfati y col. (4) y Chrétien y col. (3) observan que en los cultivos de donantes sanos y atópicos la producción de CD23s y la expresión del CD23 en linfocitos B puede ser independiente de que las células produzcan o no IgE al ser estimuladas con IL-4 recombinante.

De cualquier forma, esa posible significación del CD23s a que

nos referimos no está relacionada con el tipo enfermedad, dentro de la atopia, puesto que los niveles eran similares en los sujetos con dermatitis atópica, con rinitis o con asma extrínsecos. Aunque encontramos alguna diferencia significativa entre los grupos de rinitis y de asma, esto no se confirmó al considerar la rinitis con el grupo de rinitis más asma, muestra mucho más numerosa que la de asma puro. Por este motivo, en principio no le damos importancia a esa diferencia inicial, que probablemente se deba al número reducido de la muestra de asma puro.

No obstante, el hallazgo de valores normales de CD23s en individuos con patología similar (rinitis o asma), pero no alérgica, reclama alguna actividad biológica concreta de esta molécula en los atópicos, actividad hasta ahora ciertamente desconocida.

La razón de la elevación de los fragmentos solubles del CD23 en personas alérgicas también es desconocida. Si tenemos en cuenta que el CD23s procede de la excisión proteolítica del FcεRII/CD23, su incremento en sangre puede deberse al aumento del pool de células que llevan el receptor o del número de receptores que existen por célula. De esto nos ocupamos en la segunda parte de nuestro estudio.

También se ha comentado (51) (28) que la IgE "in vitro" es capaz de estabilizar el FcεRII/CD23 enlenteciendo, al unirse a

su receptor, el turnover de división en los fragmentos solubles. El efecto "in vivo" de esta acción no parece tener relevancia a la vista de nuestros resultados, pues en otro caso niveles elevados de IgE se hubieran correlacionado con niveles bajos del CD23s. Hay que tener en cuenta que la vida media del receptor de membrana es corta (unas dos horas) (38) y probablemente aumentar esa vida media algo más, mediante la unión de la IgE, tenga mínimas repercusiones fisiológicas.

2.- *Significación clínica del CD23s*

Desde el punto de vista clínico, nuestros resultados otorgan además al CD23s un valor como un marcador de atopia más. Su interés, como parámetro diagnóstico de enfermedades alérgicas, pensamos, no obstante, que no supera al de la IgE ya que, como sucede con ésta última, hay bastantes sujetos atópicos con niveles normales o bajos de CD23s. Un serio inconveniente como técnica de rutina es su elevado coste.

Quizás su mayor interés clínico estaría como parámetro predictivo de enfermedades alérgicas al ser determinado en sangre de cordón umbilical, si es que se confirman los resultados iniciales de algunos autores (91). En este aspecto, podría superar a la IgE, dado que la determinación de ésta última en sangre de cordón es difícil mediante técnicas de rutina por los niveles tan bajos en que aparece, cuestión que no sucede con el

CD23s.

Por otra parte, no hemos encontrado que el CD23s guarde relación con la gravedad de la clínica, pues en las diferentes patologías consideradas, sus niveles séricos alcanzaban valores similares, independientemente de que los síntomas fueran considerados leves o graves. No nos sirve pues, como marcador de gravedad de una enfermedad atópica.

Otro hecho de cierto interés derivado de nuestro estudio, es la ausencia de asociación del CD23s con los años de evolución de la enfermedad. Esto parece indicar, que las anomalías de tipo inmunológico que van ligadas al aumento de esta molécula en sangre no parecen modificarse de forma espontánea en la evolución del paciente, al menos en el tiempo en el que se englobaba nuestra muestra (hasta 30 años de evolución en algunos casos).

Merece la pena resaltar, a este respecto, los estudios iniciales de Suemura y col. (41) quienes parecen encontrar con la inmunoterapia en pacientes alérgicos, un descenso significativo del CD23s. Puede tener así, algún valor como indicador de la eficacia del tratamiento desensibilizante.

3.- *CD23s y la edad*

Kim y col. (91) observan, en un grupo reducido de niños

atópicos y normales, un descenso gradual del CD23s dependiente de la edad hasta aproximadamente los 8 años, permaneciendo a partir de ahí los niveles constantes. Las mayores cifras aparecen en niños menores de 3 años. Esto lo justifican por la variación fisiológica en el número absoluto de linfocitos que ocurre en los niños.

Nosotros, sin embargo, no hemos encontrado variaciones en el CD23s en relación a la edad dentro del rango en el que se encontraban nuestros pacientes (3-71 años), por lo que pensamos que, por lo menos a partir de los 3 años, la edad no es un parámetro de consideración en los niveles séricos del CD23s en atópicos.

La única excepción a esta valoración, la encontramos en la dermatitis atópica, donde descendieron los niveles con la edad ($R = -0.5739$, $p < 0.05$). En principio, no le encontramos explicación a este hecho, y habría que ampliar más la muestra de este grupo para confirmarlo al ser sólo 10 los pacientes con dermatitis englobados en nuestro estudio.

4.- *CD23s y número de sensibilizaciones cutáneas*

En este sentido, el CD23s ha tenido un comportamiento similar a la IgE total puesto que ninguno de los dos ha presentado relación alguna con la cantidad de sensibilizaciones de cada paciente.

5- Ausencia de relación del CD23s con la IgG4 total

Algunos estudios "in vitro" demuestran que la IL-4 induce un cierto aumento en la producción de la IgG, y particularmente de la IgG4, además de la IgE y del CD23 (10) (6). El nexo de unión entre la sobrerregulación de ambas inmunoglobulinas por la IL-4 podría estar en el CD23s, puesto que, como se sabe, esta interleukina aumenta la expresión celular del CD23 y la producción de CD23s (13) (92). Recordemos, por otra parte, que la IgG4 puede estar aumentada en sujetos atópicos, particularmente en la dermatitis atópica. A este respecto, se ha encontrado en pacientes con dermatitis atópica una correlación negativa entre la producción de IFN-gamma "in vitro" y la concentración sérica de IgG4 (129).

Nuestros resultados no confirman ninguna relación entre la IgG4 total sérica y el CD23s. Tampoco constatamos un aumento significativo de esta inmunoglobulina en los atópicos aunque, como ya hemos comentado, este es un hallazgo más propio de la dermatitis atópica. El resultado de otros autores (133), pero detectando sólo IgG total está en línea con nuestros hallazgos. Por otra parte, estos datos encontrados implican que el CD23s no parece estar relacionado con la regulación de esta inmunoglobulina.

B- ESTUDIO CELULAR

I- PORCENTAJE DE CELULAS CD23+

En el presente estudio ha quedado manifiesta la presencia de FceRII/CD23 en la membrana plasmática de linfocitos T (CD4 y CD8) y B tanto en los pacientes atópicos como en el grupo control no atópico.

De acuerdo con los hallazgos de otros autores (63) (76) (77) nuestros resultados confirman una expresión del FceRII/CD23 aumentada significativamente en los linfocitos totales de los pacientes asmáticos atópicos (con hipersensibilidad a ácaros) con respecto a los linfocitos periféricos de donantes sanos, aunque no fue así en el caso de la rinitis extrínseca. El incremento mencionado se produjo a pesar de los niveles normales o levemente elevados de IgE. Esta diferencia entre pacientes con rinitis y asma plantea la posibilidad de la importancia de "la extensión de la enfermedad atópica" en la expresión del FceRII/CD23 según estos primeros resultados.

Dentro del concepto "extensión de la enfermedad atópica" puede entenderse que en una misma patología, por ejemplo, rinitis, exista un mayor o menor grado de gravedad clínica, habitualmente, en los individuos alérgicos, asociado a cifras elevadas o bajas de IgE, respectivamente. También puede entenderse como nivel de

organicidad, en nuestro caso rinitis o asma. A este último término es al que nosotros nos referimos, pues, como se ha comentado, siempre partimos de pacientes con clínica leve, a nivel del órgano afectado, y con cifras de IgE sin diferencias significativas entre los dos grupos (128 +/- 232 kU/l para la rinitis y 162 +/- 177 en el asma).

Es de interés resaltar, por tanto, que el grupo de pacientes estudiados desarrollaban una enfermedad atópica (rinitis o asma) de carácter leve y cifras de IgE sérica total normales o ligeramente elevadas.

En este sentido, mediante técnica de rosetas, Spiegelberg y col. (61) no encontraron en individuos atópicos moderados, con rinitis y/o asma y/o dermatitis atópica (DA), y con niveles normales o moderadamente elevados de IgE, mayor porcentaje de linfocitos totales con FcεRII, respecto a sanos (y sin relación con la IgE sérica). Quizás la menor sensibilidad de la técnica de rosetas con respecto a los anticuerpos monoclonales explique esa aparente discrepancia con nuestros resultados en asmáticos. Sin embargo, estos mismos autores encuentran en pacientes altamente atópicos (DA y asma severa con IgE elevada) un aumento significativo respecto a los controles, lo que parece corroborar la importancia de la intensidad de la atopia.

Cuando desglosamos esta población total en los subtipos más

importantes de linfocitos (B, CD4 y CD8) encontramos, sorprendentemente, que ese incremento mencionado en los linfocitos CD23+ se producía a expensas fundamentalmente de la población de linfocitos CD4+ pues en los linfocitos B y CD8+ de los asmáticos, aunque había más expresión del FcεRII en relación a los controles, la diferencia no fue significativa. Trabajos recientes conceden cada vez más importancia a la expresión del receptor de baja afinidad para la IgE (CD23) en los linfocitos T considerando el interés que tienen estas células en la regulación de la IgE, bien por interacción directa bien mediante linfocinas (63) (78). La estimulación con antígeno en pacientes alérgicos supone un aumento del CD23 sólo en la población CD4+CD29+ pero no en la población CD2+CD8+ ni CD2+CD45+ (78). Precisamente las células CD4+CD29+ influyen positivamente sobre la respuesta inmunitaria de las células T y B, es decir, tienen una función cooperadora. Sin embargo, las células que inducen funciones supresoras/citotóxicas en las células CD8+, esto es, con una función inductora de la supresión, expresan CD45.

En diferentes estudios se ha documentado que la expresión del FcεRII en linfocitos B está aumentada en los pacientes altamente atópicos, en general con asma bronquial y niveles elevados de IgE (63) (74) (47). Nosotros no hemos podido confirmar esto, si bien nuestra población no es comparable con la de estos estudios (pacientes no altamente atópicos, clínica leve y cifras normales o ligeramente elevadas de IgE).

Quizás los linfocitos B de nuestros pacientes no estaban lo suficientemente activados para expresar en cuantía el FceR1I/CD23. Otra posibilidad es que estos receptores estuviesen modulados de alguna forma a la baja. A este respecto, se ha documentado que complejos IgE-CD23s pueden interaccionar con el FceR1I de los linfocitos, entrecruzando estos receptores y suprimiendo su expresión posiblemente mediante internalización de la molécula (71). Si esto fuese así, los complejos mencionados se comportarían como mecanismo feed-back regulador de la propia producción de CD23s, y de esta forma quizás también de la síntesis de la IgE, siempre que asumamos los datos "in vitro" de algunos autores sobre la potenciación de la síntesis de esta Ig por los CD23s (4).

Cabe también la posibilidad de que en los pacientes que no son altamente atópicos, los linfocitos B se comporten de forma similar a los de pacientes no atópicos, en el sentido de que sobre ellos la IL-4 no induzca eficazmente la expresión del CD23, ya sea en su actuación a nivel de la transcripción del gen del CD23, bien porque estas células presenten un número de receptores para la IL-4 más reducido o bien porque las alteraciones a nivel del linfocinas en este grupo no sean excesivamente importantes.

II- ANALISIS DE LA DENSIDAD DE RECEPTORES

Curiosamente, el cálculo del número de receptores por célula reflejó que este se encontraba aumentado en los linfocitos CD4+ y CD8+ de los pacientes atópicos (2-4 por 10^5 lugares de unión del mab por célula), tanto del grupo de asmáticos como de rinitis, independientemente de que el porcentaje de células FceRII/CD23+ fuera superior o no. Es decir, los linfocitos T, tanto helper como supresores, de los atópicos expresan mayor densidad de receptores FceRII aunque para los CD4+ en el caso de los pacientes con rinitis y el cualquier caso para los CD8+, el porcentaje de población que tenía este receptor no era significativamente superior a los controles sanos. Estos resultados pueden ayudar a explicar el aumento del CD23s encontrado en los atópicos, como ya documentamos en la primera parte del estudio.

Una importante observación es que, una vez más, los asmáticos destacaban en la expresión del número de lugares de unión del mab anti-CD23 respecto a la rinitis, a pesar de que esto no quedaba reflejado en la fracción soluble.

Los resultados obtenidos confirman que la intensidad de expresión del FceRII/CD23 está relacionada con la extensión de la enfermedad atópica, con el nivel de organicidad, de forma más determinante que la condición de atopia en sí, puesto que fue en los asmáticos donde se encontraron las mayores diferencias no

sólo de porcentaje de población CD23+ sino también del número de receptores en cada célula. Queremos resaltar a este respecto, que la cifra de IgE total sérica tampoco es determinante en la diferencia entre los dos grupos ya que, como hemos documentado, no había diferencias significativas entre las muestras. Es decir, el nivel de IgE sérica no es el único factor responsable del aumento del CD23 en los linfocitos T.

No obstante, el número de receptores también estaba aumentado en el grupo de rinitis, lo cual indica que la cualidad de atopia va ligada a un incremento, al menos, del número de FcεRII/CD23 por célula en los linfocitos T. La razón de la elevación del CD23 celular en atópicos es desconocida.

Prinz y col. (78) han encontrado "in vitro" un incremento en la expresión del CD23 en los linfocitos CD4 de pacientes alérgicos al veneno de abeja y a mosquitos tras la estimulación con el alérgeno. No se sabe si esto sería efecto de una acción directa del alérgeno sobre los linfocitos o el resultado secundario a la secreción de linfocinas (ej. IL-4) después de la estimulación alérgica. Nuestros datos en pacientes atópicos pueden ir también en esa línea y es probable que la exposición al alérgeno "in vivo" induzca, de alguna manera, la expresión de CD23 en los linfocitos T helper y quizás también en los supresores. Este incremento se puede manifestar tanto aumentando el porcentaje de células con FcεRII/CD23 como la densidad de

receptores por célula.

Del análisis porcentual y del análisis de la densidad de receptores deducimos también que éste último se muestra más sensible a la hora de detectar cambios en la expresión del CD23, al menos en atópicos. Sin embargo, es curioso observar la ausencia de relación entre el porcentaje de células que tienen el receptor de baja afinidad y la densidad de los mismos. Es decir, los pacientes que tenían mayor porcentaje de células CD23+ no expresaban necesariamente más receptores en cada célula. En nuestra opinión, cada paciente debe tener un límite particular en cuanto al porcentaje y densidad de receptores que manifiestan, y lo realmente trascendente probablemente sea la expresión global.

III- EDAD, AÑOS DE EVOLUCION Y CD23

En línea con los datos de Kim y col. (91), quienes no encuentran correlación entre el porcentaje de linfocitos CD23+ y la edad en niños mayores de 3 años, nuestros pacientes (rango de edad 6-39 años) no presentaron diferencias dependientes de la edad en el número absoluto de linfocitos FcεRII/CD23+ (ej. fig. 31-36). Además tampoco encontramos esa diferencia en los distintos subtipos de linfocitos CD23+ (B, CD4 y CD8). En niños menores de 3 años, los autores mencionados sí han encontrado

diferencias, con un aumento de los linfocitos CD23+ en los niños alérgicos en esa época de la vida.

No se pudo establecer asociación entre los años de evolución de la enfermedad y la expresión del receptor de baja afinidad, por lo que éste no es un parámetro que modifique la expresión del CD23, al menos en los periodos considerados en nuestros pacientes, que recordemos no estaban sometidos a tratamiento desensibilizante alguno.

Estos datos coinciden con los ya comentados previamente en el caso del CD23s.

IV- CD23s Y POBLACIONES CELULARES CD23+

En vista del hecho que el CD23s procede de la excisión proteolítica del receptor de membrana (FceRII) (26) (29) (47) y que, teóricamente, cualquier célula FceRII/CD23+ puede ser fuente del mismo correlacionamos en nuestros pacientes esa fracción soluble con las distintas poblaciones celulares estudiadas para determinar, en este sentido, su importancia.

Aseverando la trascendencia de la población CD4+CD23+ encontramos en los asmáticos que la única correlación del CD23 sérico ocurrió con el número de receptores CD23 de los linfocitos CD4+.

Concomitantemente con el aumento de receptores CD23 en linfocitos CD4+ aparecía más cantidad de CD23 sérico.

Este hecho llama la atención si tenemos en cuenta la importante población de linfocitos B CD23+ y su decisiva contribución a la población CD23+ total (fig. 25). Sin embargo, estas células mostraron menor número de receptores que los linfocitos T. Aparte de esto, no conocemos datos sobre la estabilidad del CD23 dependiendo del tipo celular que lo exprese y existe la posibilidad de que en algunas células la divisibilidad del receptor sea mayor que en otras, contribuyendo así más fácilmente a la fracción soluble.

En línea con esto, se está estudiando en la actualidad la presencia de moléculas accesorias del FcεRII que pudieran estar implicadas en la formación de complejos FcεRII-IgE, puesto que se ha visto que la fracción solubilizada de determinadas líneas celulares tienen mayor afinidad por la IgE que otras (41). Recordemos que la IgE tiene la cualidad de estabilizar al receptor, retardando su división.

Por tanto, la población CD4+CD23+ parece contribuir de forma decisiva a la cantidad de la forma soluble del FcεRII en los asmáticos, y quizás de esta forma también intervenga en la regulación de la IgE. Esta única correlación descarta, por otro lado, la posibilidad de que el FcεRII/CD23 encontrado en los

linfocitos T sea por adsorción del CD23s sobre la membrana plasmática como ha planteado algún autor (27).

La ausencia de correlación en el grupo de rinitis podría explicarse por el menor número de receptores expresados en los linfocitos de estos pacientes, si bien no había diferencias entre el CD23s de las dos muestras, asmáticos y rinitis. De cualquier forma, la correlación encontrada en los asmáticos no era excesivamente fuerte y no hay que olvidar que otras células hematológicas, además de los linfocitos, pueden contribuir al CD23s. La aportación de todas estas células CD23+ al CD23s probablemente impide encontrar altas correlaciones con ninguna de ellas en particular. En un estudio más amplio habría que considerar todas las poblaciones celulares CD23+ para obtener conclusiones más definitivas.

V- IgE TOTAL Y POBLACIONES CELULARES CD23+

El número de FcεRII/CD23 en linfocitos podría estar modulado por las concentraciones séricas de la IgE, de tal manera que a altas concentraciones de esta inmunoglobulina se deberían detectar más receptores CD23 y menos CD23s. Esta relación en los escasos estudios clínicos publicados no ha sido establecida (61) (129). Spielgelberg y col. (61) no observan con la inyección de IgE humana a monos variaciones en el número de células FcεRII+.

En nuestra primera parte del trabajo ya comentamos la ausencia de correlación entre el CD23s y la IgE. En esta otra parte es difícil sacar conclusiones a este respecto dado que los niveles de IgE sérica era normal o ligeramente elevada en ambas muestras. Sin embargo, encontramos algún dato que merece comentarse.

La única correlación significativa que encontramos entre la IgE sérica y alguna población CD23+ sucedió en los asmáticos y con el número de receptores FcεRII de la población CD4+CD23+ y esta correlación fue inversa. En el resto de células (en asma y rinitis), tanto considerando el porcentaje como la densidad del CD23, no encontramos ninguna correlación con la IgE sérica, por lo que no podemos establecer ninguna asociación firme entre el receptor de baja afinidad y la regulación de la IgE en este tipo de estudio.

Nuestros hallazgos no pueden confirmar los estudios "in vitro" de algunos autores (125) (134) (135) que encuentran que los IgE-BFs liberados de las células T en pacientes asmáticos aumentan la síntesis de IgE de los linfocitos B. Además apoyan la ausencia de transcendencia sobre la expresión del CD23 que debe tener la estabilización de la molécula por la IgE, como ya habíamos apuntado tras los datos del CD23s. Es decir, el aumento de receptores CD23 en linfocitos T no puede atribuirse a una disminución de la autoproteólisis de este receptor debido a su estabilización por la IgE.

Aunque algunos trabajos han informado sobre la actividad potenciadora del CD23s en la síntesis de IgE (6) (4), por otra parte, se ha documentado que complejos IgE-CD23s pueden interaccionar con el FcεRII de los linfocitos, entrecruzando estos receptores y suprimiendo su expresión posiblemente mediante internalización de la molécula (71). Este fenómeno podría explicar la relación inversa encontrada en nuestro estudio entre las cifras de IgE sérica y el número de receptores CD23 en las células CD4+. Al haber más IgE se formarían esos complejos con más facilidad. Se constituye así un mecanismo feed-back regulador.

También se ha sugerido un papel neutralizante del CD23s sobre la IgE al competir por la unión de esta inmunoglobulina sobre células efectoras como eosinófilos, plaquetas o macrófagos, aliviando alguna de las reacciones mediadas por estas células (136).

De cualquier forma, nuestros datos, colectivamente considerados, son compatibles con la hipótesis de que la población CD4+CD23+ puede regular la producción "in vivo" de IgE. La activación preferencial de estas clonas por los alérgenos y la subsiguiente secreción de linfoquinas o productos de división del FcεRII/CD23 pueden contribuir a la regulación de la IgE.

VI- POBLACION CD8+CD23+

Queda por analizar la relevancia de la población CD8+CD23+, aunque en este estudio hay dos hallazgos de interés que sugieren algún papel para la misma. En primer lugar, el aumento significativo del número de receptores FcεRII/CD23+ en los pacientes atópicos (más en asmáticos) y en segundo término la marcada y significativa correlación encontrada entre las poblaciones CD4+CD23+ y CD8+CD23+.

Kawabe y col. (81) observan un aumento de la expresión del CD23 en estas células CD8 con PHA, de forma comparable a lo que sucede con los linfocitos CD4. Esto da pie a que también los alérgenos puedan actuar de forma similar.

Cabe también la posibilidad de que la expresión del CD23 ambos tipos de células T esté regulada por algún factor común, que bien podría ser la IL-4 cuya elevación se ha imputado a los individuos alérgicos (6).

CAPITULO V:

RESUMEN

RESUMEN

Desde 1975 se conoce que además del receptor clásico de la IgE de los mastocitos y basófilos existe, en algunas células, un receptor para esta inmunoglobulina pero con una afinidad por ella algo menor que el ya conocido, por lo que fue denominado receptor de "baja afinidad".

El receptor de baja afinidad para la IgE (CD23) se compone de una cadena glicoproteica única que se localiza en la membrana plasmática de linfocitos T y B, eosinófilos, monocitos, macrófagos, plaquetas, células NK, células de Langerhans y células dendríticas foliculares. Este receptor, mediante un mecanismo proteolítico da lugar a fragmentos solubles que aparecen en suero (CD23s).

Tanto al CD23 como a sus fragmentos solubles (CD23s) se le han asignado una gran variedad de funciones, la mayoría de ellas de una forma putativa, y basándose en estudio "in vitro". Entre ellas destacan la regulación del crecimiento de las células B, la citotoxicidad dependiente de anticuerpo, adhesión celular o regulación de la síntesis de la IgE.

Con respecto al papel que pueda representar esta molécula en sujetos atópicos se conoce poco y son escasos los trabajos

clínicos publicados, a pesar de los estudios "in vitro" otorgando importancia al CD23 o CD23s en la síntesis de la IgE.

Hemos querido contribuir a este conocimiento determinando, en una primera parte del estudio, los niveles séricos del CD23s en 254 sujetos con enfermedades atópicas (rinitis, asma, dermatitis atópica) y no atópicas (rinitis y asma) y correlacionando estos niveles con las cifras séricas de IgE e IgG4. El uso de controles sanos fue necesario para establecer valores de normalidad del CD23s.

Los resultados de este estudio pueden resumirse en dos puntos:

1- El CD23s puede ser un marcador de atopia útil, al encontrarse significativamente elevado en los sujetos con patología alérgica, independientemente del órgano de choque.

2- No existe correlación entre el CD23s y las inmunoglobulinas E y G4. Con estos datos no puede establecerse una relación causal entre el CD23s y la síntesis de estas inmunoglobulinas.

En una segunda parte del estudio analizamos mediante citometría de flujo la expresión del CD23 en las subpoblaciones linfocitarias más conocidas y establecimos la asociación entre las subpoblaciones CD23+ y los niveles séricos del CD23s y de la IgE total. El objetivo básico era dilucidar cuál de ellas puede

contribuir de forma más importante "in vivo" a los niveles de los fragmentos solubles del CD23 y a la regulación de la síntesis de la IgE.

Este estudio se realizó en 29 pacientes, 19 con asma y 11 con rinitis, todos ellos alérgicos a ácaros del polvo doméstico. La clínica era leve y los niveles de IgE normales o ligeramente elevados.

Los resultados, básicamente, indicaron que el CD23 se encuentra aumentado en los linfocitos CD4 y CD8 de los sujetos atópicos bien porcentualmente o bien incrementando la densidad de receptores. En los linfocitos B no observamos diferencias con los controles sanos.

La densidad de receptores se mostró más sensible a los cambios, con respecto a los controles sanos, que el porcentaje de células CD23+ y los asmáticos expresaron más receptores que los pacientes con rinitis en todas las subpoblaciones. Esto otorga alguna importancia a la extensión de la enfermedad atópica en la expresión del CD23.

La población celular CD23+ que contribuyó de forma más importante al CD23s en nuestra muestra fueron los linfocitos CD4+CD23+ puesto que fue la única con la que se obtuvo una correlación directa. No encontramos asociaciones fuertes con la

IgE sérica, salvo una correlación inversa, también con la subpoblación CD4+CD23+ en los asmáticos.

Parámetros como la edad, el tiempo de evolución de la enfermedad o el número de sensibilizaciones no influyeron en la expresión del CD23 o del CD23s.

En definitiva, podemos afirmar, por el estudio efectuado, que el CD23 y el CD23s están incrementados en los sujetos atópicos, pero no hemos podido establecer una asociación entre estas moléculas y la IgE que nos permita afirmar su participación "in vivo" en la síntesis de esta inmunoglobulina. Los resultados obtenidos más bien apuntan a lo contrario.

CAPITULO VI:
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo, analizado anteriormente, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1) El receptor de baja afinidad para la IgE (CD23) está significativamente aumentado en los linfocitos de los individuos atópicos.

2) Los fragmentos solubles del CD23 (CD23s) también se hallan incrementados, de forma muy significativa en los sujetos atópicos, por lo que constituyen, lo mismo que el receptor celular, un marcador de atopia, que por otra parte no presenta dificultades especiales para su determinación.

3) El estudio de la correlación entre la IgE total sérica y el CD23s demuestra que no existe asociación entre ambas variables. Estos resultados no hablan a favor de una relación causal entre la producción incrementada de CD23s y la de IgE; no podemos afirmar, por este tipo de estudio, que el CD23s tenga un papel potenciador de la síntesis de IgE.

Por otro lado, esta ausencia de correlación indica que el efecto estabilizador, demostrado "in vitro", de la IgE sobre el CD23, no tiene relevancia fisiológica "in vivo" o ésta es mínima, en los niveles de CD23s.



4) La elevación del CD23s no está relacionada con el tipo de enfermedad atópica que se padezca, puesto que en la rinitis, el asma y en la dermatitis atópica los niveles son similares. Además patologías respiratorias, como rinitis o asma, de etiología no extrínseca, no están relacionadas con niveles altos de CD23s, circunstancia que consolida la relación de esta molécula con la atopia, y que reclama alguna actividad biológica concreta en estas enfermedades.

5) No existe correlación significativa estadísticamente entre la edad del sujeto atópico y los niveles de CD23s, al menos en el rango de edad que nosotros hemos estudiado (3-71 años). En este punto, la dermatitis atópica fue una excepción pues en este grupo hubo una correlación inversa.

6) Los niveles del CD23s (o las alteraciones inmunológicas que los mantienen) probablemente no se modifican de forma espontánea durante la evolución de la enfermedad, al no haber encontrado correlación de aquellos con los años de evolución de la enfermedad. Un estudio prospectivo debería confirmar este hallazgo.

7) El CD23s no es útil como marcador de gravedad de la enfermedad atópica ya que no encontramos correlación con el grado de intensidad de la clínica, valorado de 1 a 3. Además el número de sensibilizaciones, detectadas mediante test cutáneos, no influye en la determinación del CD23s.

8) Los niveles de IgG4 en los atópicos no están influidos por el CD23s lo que implica la falta de relación de este con la regulación de esa inmunoglobulina.

9) Todas las subpoblaciones linfocitarias estudiadas (B, CD4 y CD8) presentan, en mayor o menor cantidad, receptores CD23 en su membrana, tanto en atópicos como en controles sanos.

10) El porcentaje de linfocitos totales que expresan CD23 es mayor en los pacientes asmáticos atópicos que en los sujetos sanos y con rinitis extrínseca. Los pacientes con rinitis no tienen, porcentualmente, mayor número de linfocitos totales CD23+ que los controles sanos.

11) En los asmáticos de nuestro estudio, el incremento de los linfocitos totales CD23+ se debe fundamentalmente a la subpoblación CD4+CD23+, pues en las otras subpoblaciones (linfocitos B y CD8) la expresión no era significativamente mayor que en los controles.

12) La densidad o número de receptores por célula es mayor en los atópicos, tanto rinitis como asma, a nivel de linfocitos T, CD4 y CD8. Deducimos que la atopia va ligada a un incremento de la densidad de receptores en los linfocitos T, aunque en algunos casos el porcentaje de células CD23+ no sea mayor a los normales. De esto se concluye que la determinación de la densidad de recep-

tores es más sensible que el cálculo del porcentaje de células con el receptor, a la hora de detectar cambios en el CD23, al menos en atópicos.

13) Como ocurre con el porcentaje de células CD23+, la densidad del CD23 también es significativamente mayor en los asmáticos que en la rinitis. La intensidad de expresión del CD23 está relacionada con la extensión de la enfermedad atópica, con el nivel de organicidad, aunque, como vimos en el estudio en suero esto no se refleja a nivel del CD23s.

14) La edad del paciente no influye en la expresión del CD23 linfocitario, al menos en el rango de nuestra muestra (6-39 años), y tampoco existe correlación entre los años de evolución de la enfermedad y la expresión del CD23 en linfocitos, datos que van en línea con los ya comentados del CD23s.

15) La única correlación, significativa estadísticamente, del CD23s ocurrió en los asmáticos con el número de receptores CD23 de la subpoblación CD4+CD23+. Esta población parece contribuir de forma decisiva al CD23s. En la rinitis no se encuentra esa correlación, quizás por la menor densidad de receptores en este grupo.

16) Aunque en el grupo de asmáticos encontramos correlación significativa e inversa entre el CD23s y el número de receptores

de la población CD4+CD23+ es difícil extraer conclusiones del papel de esta población en la regulación de la síntesis de la IgE pues los niveles de esta en los pacientes eran normales o discretamente elevados. De cualquier forma, se abre una puerta interesante para estudiar la importancia de la subpoblación CD4+CD23+ en esa compleja regulación.

17) En los sujetos atópicos existe una correlación significativa estadísticamente entre la expresión del CD23 en los linfocitos CD4 y CD8, probablemente motivado por algún factor regulador común.

18) Finalmente, como conclusión global, podemos afirmar que el CD23 y el CD23s se encuentran aumentados en los linfocitos y suero de los sujetos atópicos, respectivamente, aunque según nuestros resultados, en este tipo de estudio, no podemos relacionar este incremento con la síntesis "in vivo" de la IgE.

CAPITULO VII:

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1- TADA R. Regulation of reaginic antibody formation in animals.
Prog. Allergy, 1975, 19:122.
- 2- COFFMAN RL. Lymphokine regulation of murine IgE production.
Current Topics in Microbio and Immunol 1986, 132:127-132.
- 3- CHRETIEN I, PENE J, BRIERE F, DE WAAL R, ROUSSET F and DE VRIES J. Regulation of human IgE synthesis. I. Human IgE synthesis in vitro is determined by the reciprocal antagonistic effects of interleukin 4 and interferon gamma.
Eur J Immunol 1990, 20:243-251.
- 4- SARFATI M and DELESPESE G. Possible role of human lymphocyte receptor for IgE (CD23) or its soluble fragments in the in vitro synthesis of human IgE.
J Immunol 1988, 141:2195-2199.
- 5- PENE J, ROUSSET F, BRIERE F, CHRETIEN J, TIRI A, MACCHIA D, RICCI M, BANCHEREAU J, DE VRIES J and ROMAGNIANI S. Interleukin 5 enhances interleukin 4-induced IgE production by normal B cells. The role of soluble CD23 antigen.
Eur J Immunol 1988, 18:929-935.

- 6- PENE J. Regulatory role of cytokines and CD23 in the human IgE antibody synthesis.
Int Arch Allergy Appl Immunol 1989, 90:32-40.

- 7- FINKELMAN FD, KATONA I, URBAN J, SNAPPER CM, OHARA J and PAUL WE. Suppression of in vivo polyclonal IgE responses by monoclonal antibody to the lymphokine BSF-1.
Proc Natl Acad Sci USA 1986, 83:9675.

- 8- PENE J, ROUSSET F, BRIERE F, CHERTIEN I, PALIARD X, BANCHE-REAU J, SPITS H and DE VRIES J. IgE production by normal human cells induced by alloreactive T cell clones is mediated by IL-4 and suppressed by IFN-gamma.
J Immunol 1988, 141:1218-1224.

- 9- PENE J, ROUSSET F, BRIERE F, CHRETIEN I, BONNEFOY JY, SPITS H, YOKOTA T, ARAI N, ARAI KI, BANCHEREAU J and DE VRIES JE. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferon gamma, alfa and prostaglandin E2.
Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85:6880-6884.

- 10- SPIEGELBERG HL. Fc receptors for iGe and interleukin-4 induced IgE and IgG4 secretion.
J Invest Dermatol 1990, 94: 49-52.

- 11- PFEIL T, FISCHER A, BUJANOWSKI-WEBER J, LUTHER H, ALTMAYER P and KÖNIG W. Effect of cytokines on spontaneous and allergen-induced CD23 expression, sCD23 release and Ig(E,G) synthesis from peripheral blood lymphocytes.
Immunology 1989, 68:37-44.

- 12- BONNEFOY J, SHIELDS J and MERMOD J. Inhibition of human interleukin 4-induced IgE synthesis by a subset of anti-CD23/FcεRII monoclonal antibodies.
Eur J Immunol 1990, 20:139-144.

- 13- VERCELLI D and GEHA R. The IgE system.
Annals of Allergy 1989, 63: 4-11.

- 14- ROMAGNANI S, MAGGI E and DEL PRETE GF. Role of interleukins in induction and regulation of human IgE synthesis and their possible regulation in disease.
Proc 9th Eur Immunology Meeting 1988, 88-97.

- 15- MAGGI E, DEL PRETE G and MACCHIA D. Profiles of lymphokine activities and helper function for IgE in human T cell clones.
Eur J Immunol 1988, 18:1045-1050.

- 16- VERCELLI D, JABARA HH, ARAI K, YOKOTA T and GEHA R. Endogenous IL-6 plays an obligatory role in IL-4 induced humna

IgE synthesis.

Eur J Immunol 1989, 19:1031-1040.

- 17- VERCELLI D, JABARA HH, ARAI KI and GEHA R. Induction of human IgE synthesis required interleukin-4 and T/B-cell interactions involving the T-cell receptor/CD23 complex and MHC class II antigens.
J Exp Med 1989, 169:1295-1307.
- 18- ROMAGNANI S, DEL PRETE G, MAGGI E and RICCI M. Activation through CD3 molecule leads a number of human T cell clones to induce IgE synthesis in vitro by B cells from allergic and nonallergic individuals.
J Immunol 1987, 138:1744-49.
- 19- SUBIZA JL, CATURLA A y BUSTOS A. Bases inmunológicas de la alergia.
Medicine 1991, quinta edición, num. 99, pag.3853-3860.
- 20- UMETSU DT, JABARA HH, DeKRUYFF ABBAS AK, ABRAMS JA and GEHA RS. Functional heterogeneity among human inducer T cells clones.
J Immunol 1988, 140:4211-4216.
- 21- LAWRENCE DA, WEIGLE WO and SPIEGELBEG HL. Immunoglobulins cytophilic for human lymphocytes, monocytes and neu-

trophils.

J Clin Invest 1975, 55:268-75.

- 22- CAPRON A, DESSAINT JP, CAPRON M and BAZIN H. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. Nature 1975, 253:474-475.
- 23- RECTOR E, NAKAJIMA T, ROCHA C., DUNCAN D, LESTOURGEON D, MITCHELL RS, FISHER J, SHON AH and DELESPESE G. Detection and characterization of monoclonal antibodies specific to IgE receptors on human lymphocytes by flow cytometry. Immunology 1985, 55: 481-90.
- 24- BONNEFOY J-Y, AUBRY J-P, PERONNE C, WIJDENES J and BANCHE-REAU J. Production and characterization of a monoclonal antibody specific for the human lymphocyte low affinity receptor for IgE: CD23 is a low affinity receptor for IgE. J Immunol 1987, 138:2970-78.
- 25- YUKAWA K, KIKUTANI H, OWAKI H, YAMASAKI K, YOKOTA A, NAKAMURA H, BARSUMIAN EL, HARDY RR, SUEMURA M and KISHIMOTO T. A B cell-specific differentiation antigen CD23, is a receptor for IgE (FceR) on lymphocytes. J Immunol 1987, 138:2576-80.

- 26- KIKUTANI H, INVI S, SATO R, BARSUMIAN EL, OWAKIH H, YAMASA-KI K, KAISHO T, UCHIBAYASHI N, HARDY RR, HIRANO T, SUEMURA M and KISHIMOTO T. Molecular structure of human lymphocyte receptor for immunoglobulin E.
Cell 1986, 47:657-668.
- 27- CONRAD DH. FcεRII/CD23: The low affinity receptor for IgE.
Annu Rev Immunol 1990, 8:623-45.
- 28- LETELLIER M, NAKAJIMA T and DELESPESE G. IgE receptor on human lymphocytes. IV. Further analysis of its structure on the role of N-linked carbohydrates.
J Immunol 1988, 141:2374-2382.
- 29- DELESPESE G, SARFATI M and HOFSTETTER H. Human IgE-binding factors.
Immunology Today 1989, 10:159-164.
- 30- GORDON J, FLORES-ROMO L, CAIRNS JA, MILLSUM MJ, LANE PJ, JOHNSON GD and MacLENAN ICM. CD-23: a multi-functional receptor/lymphokine?.
Immunology Today 1989, 10:153-157.
- 31- CAPRON A, DESAINT JP, CAPRON M, JOSEPH M, AMEISEN JC and TONNEL AB. From parasites to allergy: a second receptor for IgE.

Immunol Today 1986, 7:15-21.

- 32- YOKOTA A, KIKUTANI H, TANAKA T, SATO R, BARSUMIAN EL, SUEMURA M and KISHIMOTO T. Two species of human receptor II (Fc ϵ RII/CD23): tissue specific and IL-4 specific regulation of the gene expression. Cell 1988, 55:611-618.
- 33- SUTER U, TEXIDO G and HOFSTETTER H. Expression of human lymphocyte IgE receptor (Fc ϵ RII/CD23). Identification of the Fc ϵ RIIa promoter and its functional analysis in B lymphocytes. J Immunol 1989, 143:3087-3092.
- 34- BONNEFOY JY, GUILLOT O, SPITS H, BLANCHARD D, ISHIZAKA K and BANCHEREAU J. The low-affinity receptor for IgE (CD23) on B lymphocytes is spacially associated with HLA-DR antigens. J Exp Med 1988, 167:57-72.
- 35- MARSCH DG, HSU SH, ROEBBER M, EHRLICH-KANTZKY E, FRIEDHOFF LR, MEYERS DH, POLLARD MK and BIAS WB. HLA-Dw2: a genetic marker for human immune response yo short ragweed pollen allergen Ra5. I. Response resulting from natural antigenic exposure. J Exp Med 1982, 155:1439.

- 36- BETTLER B, MAIER R, RÜEGG D and HOFSTETTER H. Binding site for IgE of the human lymphocyte low-affinity Fce receptor (FceRII/CD23) is confined to the domain homologous with animal lectins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86:7118-7122.
- 37- VERCELLI D, HELM B, MARSH P, PADLAN E, GEHA R and GOULD H. The B-cell binding site on human immunoglobulin E.
Nature 1989, 338:649-651.
- 38- KEEGAN AD and CONRAD DH. The murine lymphocyte receptor for IgE. V. Biosynthesis, transport and maturation of the B cell Fce receptor.
J Immunol 1987, 139:1199-1205.
- 39- OHNO I, HANSON CM, FITZGERALD P, NONAKA M and KATZ DH. Fc receptors for IgE (FceR) on human lymphoid cells: Inducible expression of FceRII (CD23) on lymphocytes and detection by monoclonal anti-FceRII antibody.
Cellular Immunology 1989, 121:433-446.
- 40- KIKUTANI H, SUEMURA M, OWAKI H, NAKAMURA H, SATO R, YAMASAKI K, BARSUAMIN EL, HARDY RR and KISHIMOTO R. FceR receptor, a specific differentiation marker transiently expressed on mature B cells prior to the isotype switching.
J Exp Med 1986, 164:1455-1469.

- 41- SUEMURA M, KIKUTANI H, SUGIYAMA K, UCHIBAYASHI N, AITANI M, KURITANI T, BARSUMIAN E, YAMATODANI A and KISHIMOTO T. Significado del receptor soluble FceII (RsFcII/CD23) en suero y posible aplicación del RsFceII en la prevención de las reacciones alérgicas.
Allergy Proceedings 1991, 5:12-20.
- 42- KAWABE T, TAKAMI M, HOSODA M, MAEDA Y, SATO S, MAYUMI M, MIKAWA H, ARAI K-I and YODOI J. Regulation of FceR2/CD23 gene expression by cytokines and specific ligands (IgE and anti-FceR2 monoclonal antibody). Variable regulation depending on the cell types.
J Immunol 1988, 141:1376-1382.
- 43- CHRETIEN I, HELM BA, MARSH PJ, PADLAN EA, WIJDENES J and BANCHEREAU J. A monoclonal anti-IgE antibody against an epitope (amino acids 367-376) in the CH3 domain inhibits IgE binding to the low affinity IgE receptor (CD23).
J Immunol 1988, 141:3128-3134.
- 44- NAKAJIMA K, DE WECK AL and STADLER BM. Effect of anti-IgE antibodies on IgE binding to CD23.
Allergy 1989, 44:187-191.
- 45- VERCELLI D, GOULD H and SILK H. IgE sites relevant for binding type 2 Fc epsilon receptors (FCER) on B cells.

J Allergy Clin Immunol 1987, 79:130 (abstract).

- 46- SUEMURA M, KIKUTANI H, AITANI M, YAMATODANI A, KURITANI T, KISHIMOTO S, UCHIBAYASHI N, SUGIYAMA K, BARSUMIAN EL and KISHIMOTO T. Suppression of IgE-mediated allergic reactions with recombinant soluble RceRII.
7th Int. Congress Immunol. 1989, 19-55 (Abstract).
- 47- DELESPESE G, HOFSTETTER H and SARFATI M. Low-affinity for IgE (FcERII, CD23) and its soluble fragments.
Int Arch Allergy Appl Immunol 1989, 90:41-44.
- 48- LETELLIER M, NAKAJIMA T, PULIDO-CEJUDO G, HOFSTETTER H and DELESPESE G. Mechanism of formation of human IgE-binding factors (soluble CD23): III. Evidence for a receptor (FcERII)-associated proteolytic activity.
J Exp Med 1990, 172:693-700.
- 50- LEE B-W, SIMMONS CH, WILEMAN T and GEHA R. Intracellular cleavage of newly synthesized low affinity FceReceptor (FcER2) provides a second pathway for the generation of the 28-kDa soluble FceR2 fragment.
J Immunol 1989, 142:1614-1620.
- 51- DELESPESE G, SARFATI M and RUBIO-TRUJILLO M. In vitro production of IgE-binding factors by mononuclear cells.

Immunology 1987, 60:103-110.

- 52- SARFATI M, NUTMAN T, FONTEYN C and DELESPESE G. Presence of antigenic determinants common to Fc IgE receptors on human macrophages, T and B lymphocytes and IgE binding factors.

Immunology 1986, 59:569-575.

- 53- KISAKI T, HUFF TF, CONRAD DH, YODOI J and ISHIZAKA K. Monoclonal antibody specific for T-cell-derived human IgE binding factors.

J Immunol 1987, 138:3345-3351.

- 54- ARMITAGE RJ, GOFF LK and BEVERLEY PC. Expression and functional role of CD23 on T-cells.

Eur J Immunol 1989, 19:31-35.

- 55- ISHIZAKA K. IgE-binding factors and regulation of the IgE antibody response.

Ann Rev Immunol 1988, 6:513-34.

- 56- ISHIZAKA K and SANDBERG K. Formation of IgE-binding factors by human T lymphocytes.

J Immunol 1981, 125:1692-1696.

- 57- ISIZAKA K. Control de la síntesis de IgE. En: Alergia:

Principios y práctica. Ed. Middleton E, Reed CH, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW. Ediciones Salvat, Barcelona, 1992, pp. 50-67.

- 58- IKUTA K, TAKAMI M, KIM CW, HONJO T, MIYOSHI T, TAGAYA Y, KAWABE T and YODOI J. Human lymphocyte Fc receptor for IgE: sequence homology of its cloned cDNA with animal lectins. Proc Natl Acad Sci USA 1987, 84:819-823.
- 59- LUDIN C, HOFSTETTER H, SARFATI H, LEVY CA, SUTER U, ALAIMO D, FROST H and DELESPESE G. Cloning and expression of the cDNA coding for a human lymphocyte immunoglobulin E receptor. EMBO J 1987, 6:109-114.
- 60- SUTTER U, BASTOS R and HOFSTETTER H. Molecular structure of the gene and the 5'-flanking region of the human lymphocyte immunoglobulin E receptor. Nucleic Acids Res 1987, 15:7295-7308.
- 61- SPIEGELBERG HL, O'CONNOR RD, SIMON RA and MATHISON DA. Lymphocytes with immunoglobulin E. Fc receptors in patients with atopic disorders. J Clin Invest 1979, 64:714.
- 62- SPIELBERG HL. The expression of Fc receptors on lymphocytes

of allergic patients.

Int Rev Immunol 1987, 2:63-75.

- 63- MATSUMOTO T, MIIKE T, TAKAHASHI H, HOSADA M, KAWABE T, YODOI J and HIRASHIMA M. FcεRII on T cells and IgE-binding factors in children with atopic asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 1990, 1:21-25.
- 64- CAPRON M, CAPRON A, DESSAINT A, TORPIER G, JOHANSSON SGO and PRIN L. Fc receptors for IgE on human and rat eosinophils. *J Immunol* 1981, 126:2087-2092.
- 65- GRANGETTE C, GRUART V, OUAISSI MA, RIZVI F, DELESPESE G, CAPRON A and CAPRON M. IgE receptor on human eosinophils (FcεRII). Comparison with B Cell CD23 and Association with Adhesion Molecule. *J Immunol*, 1989, 143:3580-3588.
- 66- JOSEPH M, CAPRON A, AMEISEN JC, CAPRON M, VORNG H, PANCRE V, KUSNIERZ JP and CAPRON A. The receptor for IgE on blood platelets. *Eur J Immunol* 1986, 16:306-312.
- 67- SPIEGELBERG HL. Structure and function of Fc receptors for IgE on lymphocytes, monocytes and macrophages.

Adv Immunol 1984, 35:61-88.

- 68- KIMATA H and SAXON A. A subset of natural killer cells are induced by immune complexes to display Fc receptors for IgE and IgA and demonstrate isotype regulatory function.
J Clin Invest 1988, 82:160-167.
- 69- BIEBER T, RIEGER A, NEUCHRIST C, PRINZ JC, RIEBER EP, BOLTZ-NITULESCU G, SCHEINER O, KRAFT D, RING J and STINGL G. Induction of FcRII2/CD23 on human epidermal Langerhans cells by human recombinant interleukin 4 and interferon. J Exp Med 1989, 170:309-314.
- 70- HIVROZ C, VALLE A, BROUET JC, BANCHEREAU J and GRILLOT-COURVALIN C. Regulation by interleukin 2 of CD23 expression of leukemic and normal B cells: comparison with interleukin 4.
Eur J Immunol 1989, 19:1025-1030.
- 71- SHERR E, MACY E, KIMATA H, GILLY M and SAXON A. Binding the low affinity FcεR on B cells suppresses ongoing human IgE synthesis.
J Immunol 1989, 142:481-489.
- 72- JOVER JA, CHARTASH EK, KUSHNER B, FRIEDMAN SM and CROW MK. T helper cell-induced CD23 (BLAST-2) expression: an activa-

tion marker for the high density fraction of human B cells.
Clin Immunol Immunopathol 1989, 53:99-112.

- 73- DURANDY A, THUILLIER L, FORVEILLE M and FISCHER A. Phenotypic and functional characteristics of human newborns B lymphocytes.

J Immunol 1990, 144:60-65.

- 74- DELESPESE G, SARFATI M, RUBIO-TRUJILLO M and WOLOWIEC T. IgE receptors on human lymphocytes. II. Detection of cells bearing IgE receptors in unstimulated mononuclear cells by means of a monoclonal antibody.

Eur J Immunol 1986, 16:815.

- 75- SUEMURA M, KIKUTANI H, BARSUMIAN EL, HATTORI Y, KISHIMOTO S, SATO R, MAEDA A, NAKAMURA H, OWAKI H, HARDY RR and KISHIMOTO T. Monoclonal anti Fce receptor antibodies with different specificities and studies on the expression of Fce receptors on human B and T cells.

J Immunol 1986, 137:1214.

- 76- SPIELBERG HL, O'CONNOR RD and SIMON RA. Lymphocytes with immunoglobulin E Fc receptors in patients with atopic disorders.

J Clin Invest 1979, 64:714.

- 77- PRINZ JC, ENDRES N, RANK G, RING J and RIEBER E P. Expression of Fcε receptors on activated human T lymphocytes. Eur J Immunol 1987, 17:757-61.
- 78- PRINZ CJ, BAUR X, MAZUR G and RIEBER EP. Allergen-directed expression of Fc receptors for IgE (CD23) on human T lymphocytes is modulated by interleukin-4 and interferon-gamma. Eur J Immunol 1990, 20:1259-1264.
- 79- ROSSI G, PUCILLO C, SALZANO S, PEPE S and FORMISANO S. IgE receptors. Clinical Immunology 1990, 2:51-66.
- 80- MORIMOTO C, LETVIN NL, DISTASO JA, BROWN HM and SCHLOSSMAN SF. The cellular basis for the induction of antigen-specific T8 suppressor cells. Eur J Immunol 1988, 140:2171.
- 81- KAWABE T, MAEKAWA N, MAEDA Y, HOSODA M and YODOI J. Induction of FcεRII/CD23 on phytohemagglutinin-activated human peripheral blood T lymphocytes. I. Enhancement by IL-2 and IL-4. J Immunol 1991, 147:548-553.
- 82- NUTMAN TB, DELESPESE G, SARFATI M, and VOLKMAN DJ. T cell-

derived IgE-binding factors. I. Cloned and transformed T cells producing IgE-binding factors.

J Immunol, 139:4049-4054.

- 83- SARFATI M, NUTMAN TB, SUTER U, HOFSTETTER H and DELESPESE G. T-cell-derived IgE-binding factors. II. Purification and characterization of IgE-binding factors produced by human T cell leukemia/lymphoma virus-I-transformed T lymphocytes.

J Immunol 1987, 139:4055-60.

- 84- CARINI C, MARGOLICK J, YODOI J and ISHIZAKA K. Formation of IgE-binding factors by T cells of patients infected with human immunodeficiency virus type I.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85:9214-9218.

- 85- VERCELLI D, JABARA HH, LEE B-W, WOODLAND N, GEHA RS and LEUNG YM. Human recombinant interleukin 4 induces FcεR2/CD-23 on normal human monocytes.

J Exp Med 1988, 167:1406-1416.

- 86- PFORTE A, BREYER G, PRINZ JC, GAIS P, BURGER G, HÄUSSINGER K, RIEBER EP, HELD E and ZIEGLER-HEITBROCK HWL. Expression of the Fc-receptor for IgE (FcεRII, CD23) on alveolar macrophages in extrinsic allergic alveolitis. J Exp Med 1990, 171:1163-1169.

- 87- BRUYNZEEL-KOOMEN C, van WICHEN DF, TOONSTRA J, BERRENS L and BRUYNZEEL PLB. The presence of IgE molecules on epidermal Langerhans cells in patients with atopic dermatitis. Arch Dermatol Res 1986, 278:199-205.
- 88- FOKKENS WJ, BRUIJNZEEL-KOOMEN AF, VROOM M, RIJNTJES E, HOEFSMIT EC, MUDDE GC and BRUIJNZELL. The Langerhans cell: an underestimated cell in atopic disease. Clin Exp Allergy 1990, 20:627-638.
- 89- NAGAI T, ADACHI M, NORO N, YODOI J and UCHINO H. T and B lymphocytes with immunoglobulin E Fc receptors (FceR) in patients with nonallergic hyperimmunoglobulinemia E: demonstration using a monoclonal antibody againsts FceR-associated antigen. Clin Immunol Immunopathol 1985, 35:261-75.
- 90- YANAGIHARA Y, SARFATI M, MARSH D, NUTMAN T and DELESSESSE G. Serum levels of IgE-binding factor (soluble CD23) in diseases associated with elevated IgE. Clin Exp Allergy 1990, 20:395-401.
- 91- KIM KM, NANBU M, IWAI Y, TANAKA M, YODOI J MAYUMI M and MIKAWA H. Soluble low affinity Fc receptors for IgE in the serum of allergic and nonallergic children. Pediatric Research 1989, 26: 49-53.

- 92- KEEGAN AD, SNAPPER CM, DUSEN RV, PAUL WE and CONRAD DH.
Superinduction of the murine B cell FcεRII by T helper cell clones. Role of IL-4.
J Immunol 1988, 142:3868-3874.
- 93- DEFRANCE T, AUBRY JP, ROUSSET F, VANBERVLIET B, BONNEFOY JY, ARAL N, TAKEBE Y, YOKOTA T, LEE F, ARAL K, de VRIES J and BANCHEREAU J. Human recombinant interleukin 4 induces Fcε receptors (CD23) on normal human B lymphocytes.
J Exp Med 1987, 165:1459-67.
- 94- BUJANOWSKI-WEBER J, BRINGS B, KNÖLLER I, PFEIL T and KÖNIG W. Expression of low-affinity receptor for IgE (FcεRII, CD23) and IgE-BF (soluble CD23) release by lymphoblastoid B-cell line RPMI-8866 and human peripheral lymphocytes of normal and atopic donors.
Immunology 1989, 66:505-511.
- 95- KIZCA K, FISCHER A, PFEIL T, BUJANOWSKI-WEBER J and KÖNIG W. Cell-cell interactions for CD23 expression and soluble CD23 release from peripheral lymphocytes of atopic donors.
Immunology 1989, 68:532-539.
- 96- SUEMURA M and KISHIMOTO J. IgE class-specific regulatory factors and Fcε receptors on lymphocytes.
Int Rev Immunol 1987, 2:27-35.

- 97- TANAKA M, LEE K, YODOI J, SAITO H, IWAI Y, KIM K-M, MORITA M, MAYUMI M and MIKAWA H. Regulation of Fce Receptor 2 (CD23) expression on a human eosinophilic cell line EoL3 and a human monocytic cell line U937 by transforming growth factor Beta.
Cellular Immunology 1989, 122:96-107.
- 98- KNÖLLER J, BUJANOWSKI-WEBER J, BRINGS B and KÖNIG W. Influence of IL-2 and IL-4 on the IgE synthesis and the IgE-binding factor (sCD23) production by human lymphocytes in vitro.
Immunology 1989, 66:368-375.
- 99- KÖNIG W, FISCHER A, PFEIL T and BUJANOWSKI-WEBER J. Regulation of CD23 in allergic diseases. In: Gordon J (ed): CD23. A novel multifunctional regulator of the immune system that binds IgE.
Monogr. Allergy. Basel, Karger, 1991, 29:94-123.
- 100- YAMAOKA KA, CLAESSEON H-E and ROSEN A. Leukotriene B4 enhances activation, proliferation and differentiation of human B lymphocytes.
J Immunol 1989, 143:1996-2000.
- 101- GALIZZI JP, VABRILLET H, ROUSSET F, MENETRIER C, DEVRIES J and BANCHERARU J. IFN gamma and prostaglandin E2 inhibit

IL-4 induced expression of FcεR2/CD23 on lymphocytes through different mechanisms without altering binding of IL-4 to its receptor.

J Immunol 1988, 141:1982-1988.

102- BIEBER T, RIEGER A, NEUCHRIST C, PRINZ JC, RIEBER EP, BOLTZ-NITULESCU G, SCHNEINER O, KRAFT D, RING J and STINGL G. Induction of FcεR2/CD23 on human epidermal Langerhans cells by human recombinant interleukin 4 and interferon.

J Exp Med 1989, 170:309-314.

103- KIM KM, TANAKA M, YOSHIMURA T, KATAMURA K, MAYUMI M and MIKAWA H. Regulation of IgE receptor expression on human peripheral blood lymphocytes by lymphocytosis promoting factor (LPF), lectins and dexametasone.

Clin Exp Immunol 1987, 68:418-426.

104- ARMITAGE RJ and GOFF LK. Functional interaction between B cell subpopulations defined by CD23 expression.

Eur J Immunol 1988, 18:1753-1760.

105- CROW MK, KUSHER B, JOVER JA, FRIEDMAN SM, MECHANIC SE and STOHL W. Human peripheral blood T helper cell-induced B cell activation results in B cell surface expression of the CD23 (BLAST-2) antigen.

Cellular Immunology 1989, 121:99-112.

- 106- THORLEY-LAWSON DA and MANN KP. Early events in Epstein-Barr Virus infection provide a model for B cell activation.
J Exp Med 1985, 162:45-59.
- 107- GORDON J, WEBB AJ, GUY GR and WALKER L. Triggering of B lymphocytes through CD23: epitope mapping and studies using antibody derivatives indicate an allosteric mechanism of signaling.
Immunology 1987, 60:517-521.
- 108- LUO H, HOFSTETTER H, BANCHEREAU J and DELESPESE G. Cross-linking of CD23 antigen by its natural ligand (IgE) or by anti-CD23 antibody prevents B lymphocyte proliferation and differentiation.
J Immunol 1991, 146:2122-2129.
- 109- MARX JL. New family of adhesion proteins discovered.
Science 1989, 243:1144.
- 110- PIRRON U, SCHLUNCK T, PRINZ JC and RIEBER EP. IgE-dependent antigen focusing by human B lymphocytes is mediated by the low-affinity receptor for IgE.
Eur J Immunol 1990, 20:1547-1551.
- 111- CAPRON M, KAZATCHKINE MD, FISCHER E, JOSEPH M, BUTTERWORTH AE, KUSNIER JP, PRIN L, PAPIN JP and CAPRON A. Functional

role of the alpha-chain of complement receptor type 3 in human eosinophil-dependent antibody-mediated cytotoxicity against schistosomes.

J Immunol 1987, 139:2059-2065.

112- BOLTZ-NITULESCU G, WILTSCHKE C, LANGER K, NEMET H HOLZINGER C, GESSL A, FÖRSTER O and PENNER E. Augmentation of IgE receptor expression and IgE receptor-mediated phagocytosis of rat bone marrow-derived macrophages by murine interferons.

Immunology 1988, 63:529-535.

113- RANKIN JA. IgE immune complexes induce leucotriene B4 release from rat alveolar macrophages.

Ann Inst Pasteur 1986, 137:364-369.

114- CAPRON A, AMEISEN JC, JOSEPH M, AURIAULT C, TONNEL AB and CAEN J. New fonctions for platelets and their pathological implications.

Allergy Appl Immunol 1985, 77:107-114.

115- MAZINGUE C, CARRIERE V and DESAINT JP. Regulation of IgE synthesis by macrophages expressing Fce receptors. Role of interleukin 1.

Clin Exp Immunol 1987, 76:587-593.

- 116- MACKENZIE LE, ERBE DV, PULFORD KAF, LYDYARD PM and FANGER MW. Human B cells cannot be triggered to kill target cells through their FcγRII or FcεRII receptors.
Immunology Letters 1991, 28:245-250.
- 117- CHEN SA. Mechanism of IgE homeostasis. Sequestration of IgE by murine type II IgE Fc receptor-bearing B cell hybridomas.
J Immunol 1991, 147:1581-1586.
- 118- SWENDEMAN S and THORLEY-LAWSON DA. The activation antigen blast-2, when shed, is an autocrine BCFG for normal and transformed B-cells.
EMBO J 1987, 6:1637-1643.
- 119- GORDON J, CAIRNS JA, MILLSUM MJ, GILLIS S and GUY GR. Interleukin 4 and soluble CD23 as progression factors for human B lymphocytes: analysis of their interactions with agonists of the phosphoinositide "dual pathway" of signaling.
Eur J Immunol 1988, 18:1561-1565.
- 120- CAIRNS JA and GORDON J. Intact, 45-kDa (membrane) form of CD23 is consistently mitogenic for normal and transformed B lymphoblast.
Eur J Immunol 1990, 20:539-543.

- 121- MOSSALAYI MD, LECRON JC, DALLOUL AH, SARFATI M, BERTHO JM, HOFSTETTER E, DELESPESE G and DEBRE P. Soluble CD23 (FceRII) and IL1 synergistically induce early human thymocytes maturation.
J Exp Med 1990, 171:359-365.
- 122- FLORES-ROMO L, CAIRNS JA, MILLSUM MJ and GORDON J. Soluble fragments of the low-affinity IgE receptor (CD23) inhibit the spontaneous migration of U937 monocytic cells: neutralization of MIF-activity by a CD23 antibody.
Immunology 1989, 67:547-550.
- 123- SARFATI M, RECTOR E, WONG K, SEHON AH and DELESPESE G. In vitro synthesis of IgE by human lymphocytes. II. Enhancement of the spontaneous IgE synthesis by IgE-binding factors secreted by RPMI 8866 lymphoblastoid B cell line.
Immunology 1984, 53:197-206.
- 124- SARFATI M, RECTOR E, RUBIO-TRUJILLO M, WONG K, SEHON AH and DELESPESE G. In vitro synthesis of human IgE. III. IgE potentiating activity of culture supernatants from Epstein-Barr virus (EBV) transformed B cells.
Immunology 1984, 53:207-213.
- 125- YANAGIHARA Y, KAJIWARA T, KINIWA M, YUI Y, SHIDA T and DELESPESE G. Modulation of IgE-synthesis by IgE binding

factors released by T cells of asthmatics patients with elevated serum IgE.

Microbiol Immunol 1987, 31:261-274.

126- DELESPESE G and SARFATI M: IgE-binding factors (soluble CD23) and IgE regulation.

Res Immunol 1990, 141:75-77.

127- SARFATI M, NAKAJIMA T, FROST H, KILCHHERR E and DELESPESE G. Purification and partial biochemical characterization of IgE-binding factors secreted by a human lymphoblastoid cell line.

Immunology 1987, 60:539-545.

128- FISHER RA, BERTONIS JM and MEIER W. HIV infection is blocked in vitro by recombinant soluble CD4.

Nature 1988, 331:76.

129- REINHOLD U, PAWALEC G, WEHRMANN W, HEROLD M, WERNET P and KREYSEL HW. Immunoglobulin E and immunoglobulin G subclass distribution in vivo and relationship to in vitro generation de interferon-gamma and neopterin in patients with severe atopic dermatitis.

Int Arch Allergy Immunol 1988, 87:120-126.

130- MORROW-BROWN H, STANLEY S and THAUTREY N. Prick testing for

allergens standardised by using a precision needle. *Clinical Allergy* 1981, 11:95-98.

131- MANCINI G, CARBONARA AO and HEREMANS JF. Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion.

Immunochemistry 1965, 2:235-254.

132- BÖYUM A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow.

Scand J Clin Lab Invest 1968, 21:418-426.

133- BUJANOWSKI-WEBER J, KNÖLLER I, PFEIL T and KÖNIG W. Expression of CD23 on peripheral blood lymphocytes and presence of sCD23 within sera of atopic and normal donors.

14th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunol, Berlin 1989.

134- SARYAN JA, LEUNG DY and GEHA RS. Induction of human IgE synthesis by a factor from T cells of patients with hyper-IgE states.

J Immunol 1983, 130:242-247.

135- YOUNG MC, LEUNG DY and GEHA RS. Production of IgE-potentiating factor in man by T cell lines bearing Fc receptors for IgE.

Eur J Immunol 1984,14:871-878.

136- UCHIBAYASHI N, KIKUTANI H, BARSUMIAN E, HAUPTMANN R, SCHNEIDER F, SCHWENDENWEIN R, SOMMERGRUBER W, SPEVAK W, MAUER-FOGY I, SUEMURA M and KISHIMOTO T. Recombinant soluble Fce receptor II (FceRII/CD23) has IgE binding activity but no B cell growth promoting activity.

J Immunol 1989, 142: 3901-3908.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal Integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. Jose Carlos Garcia Ortiz

titulada Aportaciones al estudio de los receptores de baja afinidad para la IgE (CD23) y de sus fragmentos solubles (CD23s) en sujetos atópicos.

acordó otorgarle la calificación de APTO CUM LAUDE

Sevilla, 21 de Mayo

19 93

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

El Presidente,

El Secretario,

El Doctorado,

