

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



FACULTAD DE MEDICINA DE SEVILLA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**LIBERACIÓN ANTÍGENO-ESPECÍFICA DE
LACTOFERRINA POR LOS NEUTRÓFILOS EN
PACIENTES ATÓPICOS.**

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
EN MEDICINA POR:

LOURDES FERNÁNDEZ DELGADO



FACULTAD DE MEDICINA DE SEVILLA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIDAD DOCENTE DE PATOLOGÍA GENERAL
Y PROPEDEUTICA CLÍNICA
ALERGOLOGÍA CLÍNICA
Prof. Dr. D. José Conde Hernández

D. José Conde Hernández, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla, Coordinador de la Unidad Docente de Patología General y Propedéutica Clínica, y de la Disciplina de Alergología y Jefe del Servicio Regional de Inmunología y Alergia del Hospital Universitario Virgen Macarena y D. Francisco Javier Monteseirín Mateo, Doctor en Medicina y Cirugía y Médico Adjunto del Servicio Regional de Inmunología y Alergia del Hospital Universitario Virgen Macarena.

Certifican: Que el trabajo presentado por Dña. Lourdes Fernández Delgado “Liberación antígeno-específica de Lactoferrina por los neutrófilos en pacientes atópicos”, ha sido realizado bajo su dirección y que plantea una hipótesis y unos objetivos alcanzables, elige el material y método adecuado para cumplir los objetivos, presenta unos resultados objetivos, que contrasta adecuadamente en la discusión y llega a unas conclusiones acordes con los resultados, por lo que reúne todos los requisitos necesarios para ser presentados y defendido como Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos oportunos expiden el presente en Sevilla a 1 de Marzo del dos mil cinco.

Fdo: Prof. Dr. D. José Conde Hernández.

Fdo: Dr. D. Francisco Javier Monteseirín Mateo.

DEDICATORIA

A mi **padre** por su apoyo continuo, y por alentarme a avanzar en nuestros conocimientos. El me enseñó que el esfuerzo merece la pena.

A mi **madre** por su amor eterno y aliento diario.

A mi **marido** por su ayuda incondicional, y constante disponibilidad.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. D. Francisco Javier Monteseirín Mateo**, artífice e impulsor de la investigación científica en alergia que ha dado por fruto este trabajo, por su generosa dedicación y las horas empleadas en la elaboración de este trabajo. Gracias Javier.

Al profesor **Dr. D. José Conde Hernández**, por su dedicación al Servicio de Alergia, y ofrecerme sus consejos y conocimientos en la elaboración de esta tesis, para él mi admiración.

A mis compañeros y amigos **Pedro Chacón y Antonio Vega**, por su constante disposición siempre que la precisé, ellos me enseñaron todo lo que sé del laboratorio. A **José Luis Pérez Formoso** por su buen humor que contribuyeron a hacer más agradables las sesiones de trabajo. Ellos consiguieron convertir el laboratorio en mi segunda casa.

A las **Dras. María Jesús Camacho Herrera e Inés Bonilla Garríguez** sin cuya colaboración, no habría podido salir adelante este trabajo.

A los **pacientes**, sin ellos realmente este trabajo no sería una realidad.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.1. Inflamación alérgica	2
1.2. Monitorización de la inflamación alérgica	3
1.3. Neutrófilos	5
1.3.1. Origen	5
1.3.2. Estructura.....	5
1.3.3. Funciones.....	7
1.3.4. Receptores para la IgE en neutrófilos humanos	9
1.3.5. Número de neutrófilos en los procesos alérgicos	10
1.4. Mecanismos por lo que el neutrófilo puede contribuir a la patogenia de los procesos atópicos.....	12
1.4.1. Degranulación y secreción.....	12
1.4.2. Moléculas de adhesión	15
1.4.3. Actividad quimiotáctica de los neutrófilos.....	17
1.4.4. Neutrófilos normo-hipodensos	17
1.4.5. Mediadores lipídicos	18
1.4.6. Radicales tóxicos de oxígeno	20
1.4.7. Síntesis y secreción de nuevas proteínas por los neutrófilos.....	23
1.4.8. Metabolismo del Ca ²⁺ y otros procesos intracelulares	26
1.5. Lactoferrina	28
1.5.1. Generalidades	28
1.5.2. Estructura y Propiedades	29
1.5.3. Niveles de lactoferrina en plasma.....	33
1.5.4. Metabolismo de la lactoferrina.....	35
1.5.5. Receptores de la lactoferrina	36
1.5.6. Papel biológico de la lactoferrina	37
1.5.7. Defensa del huésped	38
1.5.8. Regulación de la respuesta inmune por la lactoferrina.....	40
1.5.9. Papel en el metabolismo férrico	42
1.5.10. Lactoferrina y la mielopoyesis	44
1.5.11. Otras funciones de la lactoferrina.....	45
1.5.12. Posibles aplicaciones clínicas.....	48

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS49

MATERIAL Y MÉTODOS53

3.1. Pacientes y controles54

3.2. Test cutáneos56

3.3. Preparación de leucocitos polimorfonucleares, contaje y estudio de su viabilidad..57

3.4. Obtención de muestras séricas.....60

3.5. Determinación de la IgE específica61

3.6. Disociación de las inmunoglobulinas de la superficie del neutrófilo.....63

3.7. Secreción de lactoferrina estimulada por los agonistas64

3.8. Determinación de la lactoferrina65

3.9. Determinación de la función pulmonar68

3.10. Test de provocación bronquial69

3.11. Método estadístico.....73

RESULTADOS.....74

4.1. Selección de pacientes75

4.2. Estudio de la cinética: dosis y tiempo para la liberación de la lactoferrina por los neutrófilos estimulados.....77

4.3. Especificidad de la respuesta a los alergenos80

4.4. Relación entre la IgE-específica sérica y la lactoferrina liberada por los neutrófilos tras el estímulo alérgico específico84

4.5. Relación entre la lactoferrina liberada por los neutrófilos y la clínica de los pacientes atópicos (rinitis/asma)86

4.6. Estudio de la liberación de lactoferrina por los neutrófilos estimulados por diferentes alergenos a los cuales son sensibles88

4.7. Relación entre la función ventilatoria pulmonar de los pacientes y la degranulación de neutrófilos90

4.8. Relación de la liberación de lactoferrina con el grado de respuesta bronquial tras la provocación inespecífica92

4.9. Relación de la liberación de lactoferrina con el grado de respuesta bronquial tras la provocación específica94

4.10. Relación de la liberación de lactoferrina con el grado de severidad del asma bronquial.....96

DISCUSIÓN.....	98
5.1. Participación de los neutrófilos en los procesos alérgicos	99
5.1.1. Receptores de IgE en neutrófilos humanos	99
5.1.2. Exocitosis de los gránulos del neutrófilo.....	100
5.2. Características de la secreción de lactoferrina.....	101
5.2.1. Estudio de la cinética dosis y tiempo en la liberación de lactoferrina.....	101
5.2.2. Liberación alérgeno-específica.....	102
5.2.3. Liberación IgE-dependiente de lactoferrina	104
5.3. Peculiaridades diferenciales con la activación IgE dependiente de otras células que participan en los procesos alérgicos	105
5.4. Relación entre la IgE sérica y la secreción de lactoferrina.....	108
5.5. Relación entre la secreción de lactoferrina y la clínica de los pacientes atópicos	109
5.6 Relación entre la degranulación de neutrófilos y las pruebas funcionales respiratorias	110
5.6.1. Relación con la función ventilatoria pulmonar	111
5.6.2. Relación con el grado de respuesta bronquial tras la provocación bronquial .	111
5.6.3. Relación con la gravedad del asma.....	116
5.7. Consecuencias fisiopatológicas de la secreción de lactoferrina	117
CONCLUSIONES.....	121
RESUMEN.....	124
BIBLIOGRAFÍA.....	129
ABREVIATURAS CIENTÍFICAS	

INTRODUCCIÓN

1.1. INFLAMACIÓN ALÉRGICA

La llamada inflamación alérgica se caracteriza por ser un fenómeno dual o bifásico que consta de una *primera fase o respuesta inmediata* consecutiva a la liberación de mediadores primarios a partir de las llamadas células efectoras primarias, representadas por los mastocitos y basófilos, seguida de una *segunda fase o retardada* más prolongada caracterizada por la infiltración del foco inflamatorio por células efectoras secundarias entre las que destacan fundamentalmente los eosinófilos y los neutrófilos que van a liberar a su vez otros mediadores inflamatorios secundarios responsables de la respuesta tardía.

Para que se produzca la inflamación alérgica, se requiere una etapa de sensibilización previa que se inicia con la captación y procesamiento del antígeno por las células presentadoras de antígenos, continúa con la presentación del mismo al linfocito T CD4+ y consiguiente reconocimiento por parte de éste y finalmente con la interacción entre las células T y B, en donde intervienen tanto interacciones celulares directas como interleukinas liberadas por los linfocitos T, que conduce a la producción de anticuerpos de la clase IgE responsables de la sensibilización de las células efectoras primarias, mastocitos y basófilos.

En el transcurso del proceso inflamatorio, como consecuencia de la activación de diferentes poblaciones celulares, se va a provocar un aumento de la liberación de citoquinas y quimiocinas algunas de las cuales tienen capacidad para inducir la expresión en las células endoteliales de moléculas de adhesión. Estas moléculas de adhesión junto con las quimiocinas presentes en las células endoteliales van a favorecer la migración leucocitaria hacia el foco inflamatorio al interaccionar con otras moléculas de adhesión y receptores presentes en la superficie de las células migratorias.

Una vez que estas células migratorias o efectoras secundarias de la inflamación, entre las que destacan los eosinófilos y los neutrófilos, alcanzan el foco inflamatorio, donde son reclutadas y activadas, comienzan a segregar una serie de mediadores secundarios proinflamatorios. De este modo se origina una compleja trama de interacciones y de amplificación de la respuesta alérgica.

Las manifestaciones clínicas de las reacciones alérgicas IgE-mediadas derivan de los fenómenos inflamatorios que se producen como consecuencia de la generación y liberación de productos solubles por determinadas estirpes celulares.

A pesar de que se reconoce la patología atópica como un proceso en el cual se induce la liberación de mediadores y el acúmulo de células inflamatorias en el órgano de choque, y de que varias de estas células inflamatorias (macrófagos, linfocitos, mastocitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos y plaquetas) han demostrado estar implicadas en la reacción alérgica, el papel desempeñado por cada una de ellas no está del todo aclarado. Debido a la naturaleza crónica de los procesos alérgicos, los leucocitos que persisten en los tejidos, especialmente eosinófilos y linfocitos, han sido los más estudiados. Hasta hace poco tiempo se tenía una escasa noción del papel que podía ejercer el neutrófilo en la reacción alérgica, una célula con un potencial proinflamatorio y lesional importante y que se encuentra presente en el foco inflamatorio alérgico. Sin embargo, existen fuertes evidencias experimentales de la participación de los neutrófilos en los procesos alérgicos^{1, 2}. Así, se ha comprobado en éstos un aumento de la actividad quimiotáctica y quimioquinética, expresión de marcadores de activación (entre los que destacan las moléculas de adhesión), alteración de la respuesta a diversos agentes reguladores, producción de leucotrienos, liberación de componentes de los diversos gránulos citoplasmáticos, y generación y liberación de metabolitos del oxígeno. Y parece confirmarse por las investigaciones de los últimos años que el neutrófilo es una célula que interviene directa (a través de mecanismos IgE-dependientes) e indirectamente (por su acción sobre otras estirpes celulares) en la inflamación alérgica

1.2. MONITORIZACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ALÉRGICA

El tratamiento de las enfermedades inflamatorias tales como la enfermedad alérgica está basado hoy en día en recomendaciones nacionales e internacionales. En la mayoría de los casos el tratamiento funciona bien, sin embargo, en muchos casos es obvio que el tratamiento es menos exitoso. La variabilidad en el resultado del tratamiento puede deberse a muchas razones, una de la más importante es la falta de conocimiento de los mecanismos subyacentes en cada paciente. Es obvio que existe una gran variabilidad interindividual tanto en las células inflamatorias como en los mediadores involucrados en el proceso inflamatorio. Los tratamientos modernos de la enfermedad inflamatoria deben por tanto no solo considerar la entidad de la enfermedad y sus síntomas, sino también la fisiopatología subyacente con el fin de ser los más óptimos posibles para el paciente.

Para evaluar correctamente la participación de cada célula inflamatoria en particular, es necesario conocer cuales son las células que participan y su grado de participación. Durante las últimas décadas se ha intentado identificar moléculas secretadas por células inflamatorias concretas y desarrollar ensayos sensibles para detectar a estas moléculas, con el objetivo de medir la presencia y actividad de tales células inflamatorias en los procesos inflamatorios. Por ello existe un gran interés por identificar moléculas que sean marcadores específicos de las células en cuestión, de manera que al detectarse cambios en los niveles de dichas moléculas estos fueran indicativos de un cambio en el turnover y actividad de las células inflamatorias de las que son marcadores.

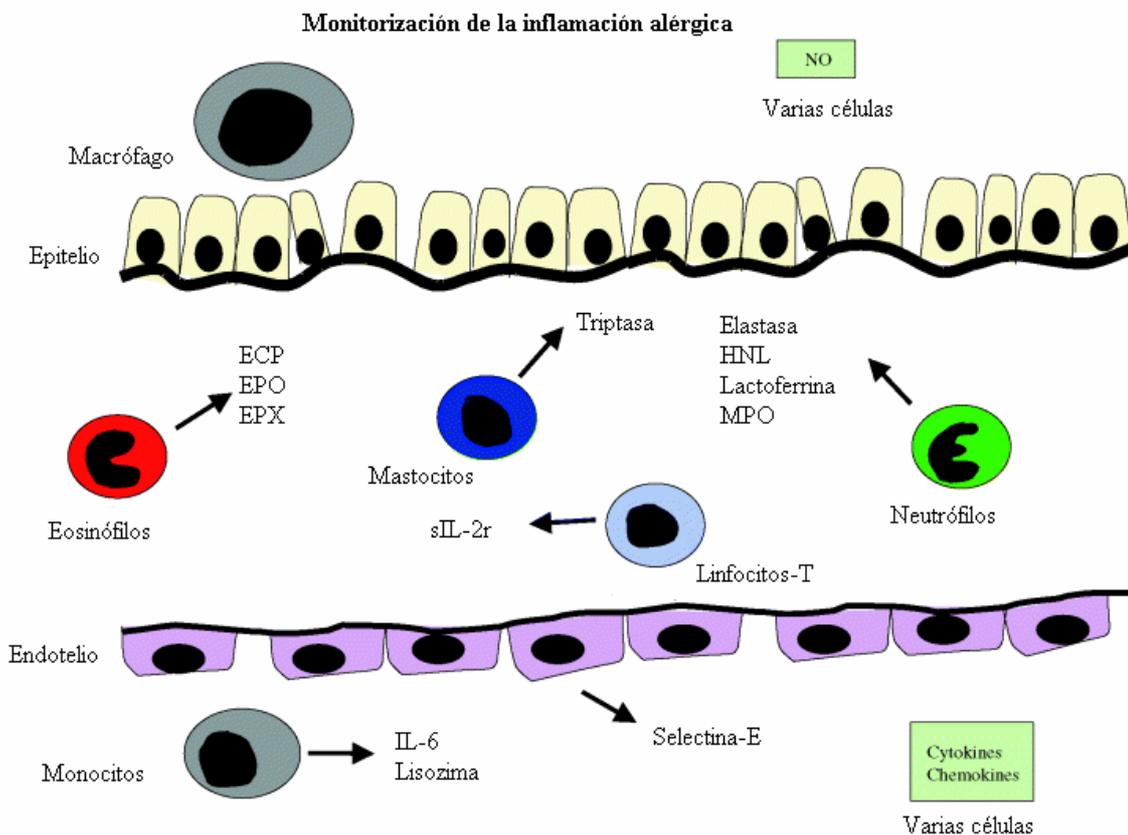


Figura 1. Células involucradas en la inflamación alérgica y proteínas secretadas por las mismas que pueden ser útiles para su monitorización, así como algunos marcadores tales como el óxido nítrico (NO), citoquinas y chemokinas que pueden ser medidos como reflejo de la actividad de la inflamación alérgica aunque no sean específicos de ninguna célula, al ser producidos y secretados por muy diferentes células.

La lactoferrina es un marcador específico de los neutrófilos cuando es estudiada en sangre pero en otros fluidos corporales no es un marcador específico de los mismos ya que algunas glándulas exocrinas pueden liberarla igualmente.

1.3. NEUTRÓFILOS

1.3.1.- Origen:

Las células fagocíticas incluyen: granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y células del sistema mononuclear (monocitos y macrófagos).

Las células fagocíticas se originan en la médula ósea, todas derivan de una célula madre mieloide conocida como CFU-GM (unidad formadora de colonia granulocitos/monocitos) procedente, a su vez, de una célula madre hematopoyética pluripotencial (CFU-S). La célula mieloide CFU-GM, presente en un 90-95% en la médula ósea, se diferencia posteriormente hacia las dos líneas progenitoras de las células fagocíticas; granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) y células fagocíticas mononucleares (monocitos-macrófagos)³⁻⁶. La proliferación de CFU-GM y su diferenciación irreversible hacia la producción de la serie granulocítica y monocítica está regulada al menos por dos factores: el GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos) que actúa sobre los precursores de la serie granulocítica y monocítica conjuntamente y el M-CSF (factor estimulador de colonias de mononucleares) que lo hace solamente sobre los fagocitos mononucleares.

1.3.2.- Estructura:

Los neutrófilos constituyen el 40-70% de todos los leucocitos en sangre periférica y algunos están presentes en el tejido conectivo; según la morfología del núcleo se distinguen dos tipos: células en banda y células segmentadas; las primeras son neutrófilos jóvenes, cuyo núcleo está indentado; en las segundas, formas maduras, se observa el núcleo constituido por un número de lóbulos que oscila entre 2 y 5, conectados por finos filamentos de cromatina.

Presentan un diámetro aproximado de 10-20 μm . Los neutrófilos, no presentan nucleolo y no pueden dividirse ni diferenciarse. El citoplasma contiene un gran número de gránulos e inclusiones de glucógeno.

- a) Se distinguen tres tipos de gránulos que pueden ser distinguidos por los distintos componentes que contienen. Nombrados por el orden de aparición en las células progenitoras de la médula ósea son los siguientes: primarios o azurófilos, secundarios o secretorios o específicos y terciarios. Los gránulos primarios o azurófilos, de 0,5 μm , forman el 10-20% del total y se producen desde el estado de promielocito, son lisosomas que contienen las enzimas

necesarias para la digestión intracelular y diversos compuestos con actividad bactericida (fosfatasa ácida, arilsulfatasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, lisozima, mieloperoxidasa, proteínas catiónicas), los gránulos secundarios o específicos, de unas 2 μm , forman el 70-85% del total de gránulos y aparecen a partir del mielocito; contienen lisozima, proteasas neutras (colagenasa), fosfatas alcalina y lactoferrina. Por último hablamos de los gránulos terciarios o de gelatinasa, normalmente asociados con la traslocación a la membrana plasmática de receptores CR₁ (receptor del complemento, C3b e C3bi, de tipo 1, CD35), CR₃ (receptor del complemento, C3b e C3bi, de tipo 3, CD18/11b), fMLP (N-formil-L-metionil-L-fenilalanina), laminina, o proteínas como la nicotinamida dinucleótido fosfato (NADPH).

	Gránulos azurófilos	Gránulos específico	Gránulos terciarios
Enzimas microbicidas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mieloperoxidasa ▪ Lisozima 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lisozima 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gelatinasa
Proteinasas neutras	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Elastasa ▪ Catepsina G ▪ Proteinasa 3 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Colagenasa 	
Hidrolasa ácidas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Glicerofosfatasa ▪ Glucoronidasa ▪ N-acetil-glucosaminidasa ▪ Manosidasa ▪ Catepsina B y D 		
Misceláneas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteínas catiónicas ▪ Defensinas ▪ Proteínas incrementadoras de permeabilidad de bacterias. ▪ Factores bactericidas derivados de gránulos azurófilos 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lactoferrina ▪ Proteínas transportadoras de vitaminas B₁₂ ▪ Activador de plasminógeno ▪ Histaminasa ▪ Receptores de fMLP, C3bi y laminina. ▪ Citocromo b₅₅₈ 	

La degranulación de los neutrófilos es un evento importante en la reacción inflamatoria, puesto que los gránulos específicos contienen productos capaces de activar al complemento por la vía alterna, formando C_{5a}. Por otro lado, los gránulos azurófilos, que se liberan tardíamente en el proceso fagocítico,

contienen inactivadores del C_{5a} y de otros agentes quimiotácticos, limitando así la extensión de la inflamación.

- b) Las inclusiones de glucógeno aparecen en el mielocito y son más numerosas a medida que la célula madura, contribuyendo al aporte energético.

Situados adyacentes a la membrana celular se disponen los microfilamentos, compuestos de actina y miosina, que serán responsables del movimiento celular.

Una vez maduro, el neutrófilo permanece en la médula ósea, que actúa como reservorio (conteniendo un 93% de todos los neutrófilos), o lo abandona en respuesta a estímulos apropiados pasando a la circulación. La vida media del neutrófilo en la circulación es de unas seis horas, pasadas las cuales y debido probablemente a estímulos quimiotácticos se adherirá a la superficie endotelial, constituyendo los llamados neutrófilos marginados, y comienzan a rodar sobre las paredes de los vasos de una forma lenta, proceso mediado por moléculas de adhesión. Hay factores microambientales que afectan la expresión de estas moléculas y promueven así la adhesión de los neutrófilos al endotelio tales como: GM-CSF, IFN- γ (interferón gamma), endotoxina, TNF (factor de necrosis tumoral), IL-1 (interleukina-1), LT B₄ (leucotrieno B₄), PAF (factor activador de plaquetas), y fMLP.

1.3.3.- Funciones:

La función primordial de los neutrófilos es la defensa del huésped, específicamente la fagocitosis y destrucción de los agentes patógenos en los tejidos. La célula responde a estímulos quimiotácticos generados en el tejido afectado que inducen la marginación (adherencia a las células endoteliales) y diapédesis a través de la pared de los vasos de la microcirculación hacia el lugar de la lesión, donde intentará destruir al agente causante de ésta. Por eso, el proceso de acumulación de los neutrófilos en los tejidos para la defensa del huésped es esencial para la supervivencia. Esta acumulación es un proceso controlado resolviéndose el proceso inflamatorio de forma aguda con la desaparición del agente causante. Sin embargo, si los mecanismos de control fallan, existe una respuesta exagerada o persiste el estímulo (como sucede en los enfermos alérgicos), la acumulación y activación de los neutrófilos contribuyen a la lesión tisular.

Los neutrófilos fagocitan las bacterias y otros agentes infecciosos. Estas partículas opsonizadas con anticuerpos IgG y complemento se adhieren a los neutrófilos mediante sus receptores Fc y CR₁, siendo internalizadas en un proceso dependiente de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺. Paralelamente el neutrófilo incrementa el consumo de oxígeno, iniciado antes de

la ingestión y degranulación, lo que se denomina “estallido respiratorio”, que consiste en una exacerbación del metabolismo celular que destruirá la partícula fagocitada. Este “estallido respiratorio” se inicia con la activación de una oxidasa (NADH ó NADPH oxidasa) que estimulará la lanzadera hexosa monofosfato, el ciclo de glutatión, etc; los productos que se obtienen son anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales oxidrilos e hidroxilos. Estos derivados tóxicos del oxígeno destruyen los microorganismos, pero también pueden afectar a células vecinas del propio organismo. Para protegerlos se elaboran una serie de enzimas durante la inflamación aguda: superóxido dismutasa, que convierte el ión superóxido en peróxido de hidrógeno, el cual es convertido en agua por una catalasa.

Una vez en marcha “el estallido respiratorio” se inicia la degranulación. Los gránulos del neutrófilo se asocian a las vesículas fagocíticas vertiendo su contenido enzimático y formando el lisosoma secundario.

Hay estudios in vivo que demuestran la movilización secuencial de las vesículas y gránulos de los neutrófilos tras estimulación con mediadores inflamatorios. Se ha demostrado una jerarquía en la movilización de los cuatro compartimentos: vesículas secretoras, gránulos de gelatinasa, gránulos específicos y gránulos azurófilos³⁻⁷. El contenido de las vesículas secretoras es citotóxico, estas vesículas se forman durante la maduración del neutrófilo en la médula ósea, contienen fosfatasa alcalina, proteína de adhesión MAC-1 (intracellular adhesion molecule-1), receptores para péptidos formilados con actividad quimiotáctica y CR₁⁸⁻¹², y su matriz contiene proteínas plasmáticas¹³. Los gránulos de gelatinasa contienen gelatinasa. Los gránulos específicos contienen lactoferrina, vitamina B₁₂ ligada a proteínas y otras proteínas. Los gránulos azurófilos contienen mieloperoxidasa (MPO), defensinas y proteasas como elastasa y proteinasa-3¹⁴. La membrana de los gránulos de gelatinasa y de los gránulos específicos contienen MAC-1, receptores para quimioatrayentes además de otros receptores, y también un único citocromo-b que funciona como componente terminal del radical de oxígeno generando HADPH-oxidada^{5, 7, 10, 14-17}. Cuando los neutrófilos son estimulados con mediadores inflamatorios, hay una movilización de las vesículas secretoras, un 20-25% de la gelatinasa sufre exocitosis y un 5-7% de la lactoferrina se libera de los gránulos específicos.

La mayor parte de los estudios sobre la activación de los neutrófilos y movilización de sus gránulos, se ha realizado en neutrófilos de sangre periférica. Sin embargo, los neutrófilos ejercen su función in vivo principalmente después de la

extravasación de la corriente sanguínea. Durante la extravasación, los neutrófilos primero entran en íntimo contacto con el endotelio vascular, después con la membrana basal y finalmente entran en contacto con los mediadores inflamatorios, incluyendo citoquinas producidas por células del tejido conectivo circundante a los vasos.

Los gránulos de gelatinasa se movilizan más exhaustivamente durante la extravasación, que los gránulos específicos y azurófilos, lo cual puede ser crucial porque la liberación de proteína colagenolítica como es la gelatinasa puede facilitar la migración del neutrófilo al tejido perivascular. Por otra parte, los gránulos específicos y azurófilos (que contienen más enzimas destructoras de tejidos y sustancias bactericidas), sufren exocitosis parcialmente. Una explicación para esta liberación durante la extravasación es que el neutrófilo se activa por el contacto íntimo con el endotelio y la matriz extracelular. La unión de los ligandos a β_2 -integrinas y L-selectinas produce un incremento en el Ca^{2+} citosólico que es la principal señal del neutrófilo en la exocitosis.

Aparte de las funciones clásicas ya conocidas, hoy se van conociendo poco a poco otras muchas funciones del neutrófilo, que le están confiriendo un papel cada vez más importante dentro de la respuesta inmuno-inflamatoria. Quizás el mayor problema para investigar la activación de los neutrófilos sea que son verdaderas “bombas enzimáticas”, por lo que estas enzimas destruyen las propias consecuencias de la activación celular.

1.3.4.- Receptores para la IgE en neutrófilos humanos:

La liberación de mediadores a partir de las células implicadas en la reacción alérgica, se inicia gracias a la presencia en su superficie de receptores para moléculas de IgE que reconocen específicamente al alérgeno responsable de la patología del enfermo atópico. Dos moléculas de IgE unidas a través de sus fragmentos Fab, con un antígeno (alérgeno) bivalente o polivalente, están fijadas a la superficie celular por su fragmento Fc que se une a receptores Fc específicos para las cadenas pesadas ϵ , llamados Fc ϵ R, identificándose tres formas conocidas de receptores para la IgE: el heterotrimérico receptor de alta afinidad (Fc ϵ RI)^{18,19}, el receptor de baja afinidad (Fc ϵ RII/CD23)^{20,21} y el Mac-2/IgE-binding protein (ϵ BP) o Galectina-3²²⁻²⁴. Como consecuencia se produce una metilación de los fosfolípidos, formación del canal del ión calcio y liberación de mediadores preformados y no preformados (sintetizados de novo).

Hasta hace poco no se había demostrado en los neutrófilos la presencia de receptores para IgE, de manera que el descubrimiento de que los neutrófilos poseían las

tres formas conocidas de receptores para la IgE ha sido un punto de vital importancia para demostrar que toma parte activa en la reacción alérgica. El Mac-2/IgE-binding protein (ϵ BP) fue el primer receptor para la IgE descrito en los neutrófilos humanos y mediante codificación de su ADNc ha demostrado ser distinto del Fc ϵ RI y del Fc ϵ RII²⁵,²⁶. Esta proteína (Mac-2) se expresa principalmente en la superficie celular de macrófagos murinos peritoneales estimulados con tioglicolato, líneas celulares macrofágicas, células dendríticas interdigitantes, e incluso en el citoplasma de algunas células epiteliales²⁷⁻²⁹. En algunos trabajos no sólo se ha demostrado la presencia de estos receptores, sino que se ha comprobado que existen rasgos característicos en los pacientes alérgicos:

- El número de neutrófilos positivos para el Mac-2 es similar en los pacientes atópicos que en controles sanos²² y no se ha encontrado ninguna diferencia, tras la estimulación IgE-mediada, en la expresión de este receptor.

- El porcentaje medio de los neutrófilos de sangre periférica positivos para el Fc ϵ RI fue del 70% en enfermos asmáticos comparados con el 4% del grupo de controles sanos. Así mismo, se pudo comprobar cómo los neutrófilos de los lavados alveolares de los enfermos asmáticos también poseían Fc ϵ RI¹⁹.

- Yamaoka et al han demostrado que el granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) es capaz de estimular la síntesis y una mayor expresión del Fc ϵ RII/CD23 en neutrófilos humanos de donantes sanos, tras 18 horas de incubación²⁰, sin embargo no se ha podido comprobar un aumento de expresión en neutrófilos de pacientes alérgicos sin inmunoterapia. En los pacientes atópicos existe un aumento del Fc ϵ RII/CD23 en los neutrófilos incubados solo en el medio de cultivo sin la adición de ningún factor estimulador. Posiblemente, la estimulación “*in vivo*” de los neutrófilos de los pacientes con GM-CSF pudiera hacerlos no reactivos a una posterior estimulación “*in vitro*” con el mismo factor²¹.

1.3.5.- Número de neutrófilos en los procesos alérgicos:

Tal y como hemos comentado anteriormente cada día existen más evidencias de la participación de los neutrófilos en los procesos alérgicos. Este hecho se apoya en la comprobación de un número elevado de neutrófilos en los procesos alérgicos.

En los tests de provocación ocular se comprueba como en la reacción inmediata (a los 30 minutos) se detecta un aumento de células inflamatorias: neutrófilos (11-20 por campo), eosinófilos (2-4 por campo) y linfocitos (2-5 por campo). A las 6 horas

(reacción semitardía), además de la neutrofilia (7-12 por campo), existe una infiltración significativa de eosinófilos (5-9 por campo) y linfocitos (3-10 por campo). En la reacción tardía (a partir de las 24 horas), nos encontramos con una menor celularidad, neutrófilos (2-5 por campo), eosinófilos (2-4 por campo) y linfocitos (3-7 por campo). Estos sucesos se producen específicamente con el alérgeno y no se producen cuando se estimula el órgano de choque inespecíficamente con histamina. Estos hallazgos los podemos encontrar en pacientes en los que persista el estímulo antigénico aunque no tenga sintomatología³⁰⁻³⁴. Por otra parte no se han encontrado diferencias en el número de eosinófilos entre la conjuntivitis estacional y perenne, aunque sí se ha constatado un aumento de neutrófilos y linfocitos en la segunda respecto a la primera³⁵.

En los enfermos con rinopatía extrínseca con y sin síntomas, tras el lavado nasal no se encuentra mayor cantidad de neutrófilos con respecto a una población normal; pero sí una mayor cantidad de MPO³⁶. Después de realizar un test de provocación nasal con PAF se encuentra un aumento significativo de neutrófilos y de MPO en los lavados nasales, correlacionándose los valores de ambos parámetros en los mismos³⁷. Tras provocación antígeno-específica se encuentra en la respuesta inmediata y tardía un aumento de neutrófilos, con respecto a la provocación con una solución de control³⁸; en las respuestas tardías también se obtienen los mismos resultados³⁹. Esta neutrofilia se correlaciona con la presencia en los lavados nasales de histamina, IL-6, ECP y eosinófilos³⁹. En biopsias obtenidas 24 horas después de la provocación también se encuentra un aumento significativo de neutrófilos y, este aumento se ve inhibido por la administración de inmunoterapia a doble ciego con placebo⁴⁰.

En esputos inducidos, en asmáticos, se observa que existe un aumento de neutrófilos no sólo en los cuadros agudos^{41, 42}, sino también en los cuadros severos y persistentes del asma⁴³.

En los lavados broncoalveolares (BAL) se detecta un aumento significativo de neutrófilos en pacientes asmáticos sintomáticos, con respecto a un grupo de referencia. Los neutrófilos se detectan en pequeña proporción en pacientes que no han sido estimulados mediante una provocación antigénica. Ésta induce una reacción inflamatoria que generalmente conlleva la acumulación de neutrófilos sobre todo en la fase tardía⁴⁴⁻⁴⁷, al igual que el ozono o la hipernea isocápnica^{48, 49}. En el BAL de los pacientes que sufren empeoramiento nocturno existe un resurgimiento de la acumulación de células inflamatorias (a las 4 de la mañana se encuentra la mayor cantidad de neutrófilos⁵⁰), que revierten a la mañana siguiente. Los neutrófilos que se

obtienen de los BAL dan muestras de estar activados, como son la mayor expresión de moléculas de adhesión en su superficie celular⁵¹. Estas células podrían tener un papel adicional en el proceso inflamatorio bronquial como sería facilitar la acumulación posterior de eosinófilos, al igual que ocurre con los monocitos⁵². La mayor concentración y especificidad de las proteasas que contienen los neutrófilos pueden permitirle abrir las barreras celulares del tejido conectivo para la emigración y facilitar el camino a otras células inflamatorias con posterioridad.

En contra de los hallazgos obtenidos en los BAL, el estudio de los neutrófilos en las biopsias de los enfermos asmáticos en reposo o tras activación presenta resultados contradictorios⁵³⁻⁵⁵. Una de las causas sería la posible acumulación de estas células en sitios donde habitualmente no se realizan biopsias como los bronquiolos terminales, o la posibilidad de que los neutrófilos con el paso del tiempo no puedan distinguirse bien técnicamente, o lo que es más probable que estos sufran muerte celular (apoptosis) de forma más temprana que por ejemplo los eosinófilos. Existen trabajos que demuestran la presencia de estas células a las 4-6 horas después, mientras que no se hallan a las 24 horas de la misma⁵⁴. En pacientes que mueren como consecuencia directa de su proceso asmático, si la muerte se produce de forma rápida existe una mayor acumulación de neutrófilos, mientras que si ésta es más lenta, las células predominantes son los eosinófilos⁵⁶.

1.4. MECANISMOS POR LO QUE EL NEUTRÓFILO PUEDE CONTRIBUIR A LA PATOGENIA DE LOS PROCESOS ATÓPICOS

Algunos de los mecanismos principales por los que estas células pueden contribuir al inicio, desarrollo y mantenimiento de la reacción alérgica y su posible expresión en los enfermos atópicos son:

1.4.1.- Degranulación y secreción:

Durante las reacciones inflamatorias, en la respuesta más inmediata, los neutrófilos interaccionan con los vasos del lecho microvascular y migran, con la consiguiente degranulación y secreción del contenido de los gránulos. Además de la secreción del contenido de estos gránulos, las células activas también secretan otras proteínas, hidratos de carbono y lípidos procedentes de fuentes no granulares.

Los procesos migratorios no siempre tienen importancia definitiva, siendo posible que la interacción de las células activadas con la pared vascular pueda desembocar en

una secreción sin migración. Esto favorecería el desarrollo de las lesiones en el tejido de las vías aéreas sin que necesariamente estas células inflamatorias tuvieran que hallarse en el tejido circundante.

La degranulación y secreción de las dos clases mayores de gránulos están reguladas separadamente. Los ionóforos cálcicos inducen secreción de gránulos específicos, mientras que los ionóforos de cationes monovalentes causan liberación de los azurófilos. Los gránulos secundarios se fusionan más pronto, con diferentes estímulos y con más rapidez que los azurófilos. Se ha postulado que ello permitiría la acción de ciertas enzimas del fagosoma antes de que el pH intrafagosomal cayera lo suficiente como para inactivarlas, además suministraría a la membrana citoplasmática nuevos receptores y moléculas de adhesión para una capacidad quimiotáctica y adhesión óptimas ^{14, 57-60}.

Los neutrófilos contienen y pueden secretar varias potentes proteasas, incluyendo la elastasa de los neutrófilos, catepsinas y colagenasa. Es posible que algunas de estas enzimas puedan permanecer pegadas a la membrana celular ⁶¹ y posibiliten la digestión de proteínas específicas o sustratos de células a las cuales los neutrófilos se adhieren. La importancia de estas proteasas radica en su abundancia y su amplio espectro de acción.

A las proteasas de los neutrófilos se les ha atribuido tener un papel crítico en la penetración celular a los tejidos, al abrir huecos en las barreras y/o creando nuevos quimioatrayentes a partir de la fragmentación de proteínas del tejido conectivo ⁶², lo que puede generar un daño significativo en los tejidos, particularmente en presencia de un exceso de oxidantes. Los neutrófilos primados y estimulados, que permanecen adheridos a las células endoteliales o epiteliales durante largos períodos de tiempo son muy destructivos ^{63, 64}. Algunos de estos procesos son mediados por la elastasa, incluso en presencia de todas las antiproteasas del suero. Más trascendente que la citotoxicidad directa que se puede provocar es el hecho de que las enzimas proteolíticas desencadenan en los tejidos circundantes la desunión de sus células, a consecuencia de los fenómenos de destrucción proteolítica que se ven incrementados en presencia de oxidantes ⁶⁵. El efecto destructor de las proteasas en el tejido pulmonar es bien conocido en el caso del enfisema pulmonar. El asma bronquial no parece estar asociado con una anomalía funcional de la α_1 -antiproteasa, pero en algunos casos se ha detectado elastasa extracelular por métodos inmunohistoquímicos en las vías aéreas de enfermos asmáticos, y nuestro servicio, conjuntamente con otros, ha demostrado una mayor cantidad de fenotipos deficientes de α_1 -antitripsina en enfermos atópicos ⁶⁶⁻⁶⁸.

Las proteasas pueden actuar en algunas circunstancias como moléculas de comunicación celular, por ejemplo favoreciendo la función de los mediadores. La catepsina G neutrofílica también ha demostrado ser un eficiente mediador en las interacciones neutrófilos-plaquetas⁶⁹⁻⁷¹. Del mismo modo las proteasas son agentes que pueden primar de forma efectiva a los macrófagos⁷². La habilidad de la elastasa y la catepsina G neutrofílicas de estimular la secreción de moco de las vías aéreas también es otro ejemplo de cómo estas sustancias pueden ejercer funciones “*per se*” en el órgano de choque, que no se corresponden estrictamente con el mecanismo inflamatorio directo⁷³. Curiosamente, parece que las enzimas proteolíticas también presentan capacidad de regular a su vez ciertos mecanismos inflamatorios. Así, se ha demostrado como inactivan a la citoquina proinflamatoria TNF- α ⁷⁴.

El interés actual sobre las proteínas catiónicas derivadas del eosinófilo ha potenciado la investigación sobre el papel de estas sustancias derivadas del neutrófilo. Los gránulos azurófilos poseen varias proteínas altamente catiónicas, como son: defensinas (péptidos de neutrófilos humanos (HNP), catepsina G, proteína catiónica antimicrobial de 37 kD (CAP37) y proteína inductora bactericida/permeabilidad (BPI). La carga positiva de ciertas proteínas neutrofílicas, parece que contribuye a sus funciones y así tenemos que los policationes tienen múltiples efectos sobre diferentes células y tejidos, incluyendo alteraciones en las funciones de las vías aéreas de animales de experimentación, que parecen ser debidas exclusivamente a su carga⁷⁵.

La MPO liberada de los neutrófilos puede reaccionar con el HO, generado durante el estallido respiratorio, juntamente con un haluro (usualmente Cl⁻) para generar OHCl y otros compuestos similares que pueden provocar lesión del tejido circundante durante los procesos inflamatorios. No se han encontrado diferencias significativas en el cociente niveles séricos de MPO/número de neutrófilos de sangre periférica, entre los pacientes atópicos y los controles sanos de referencia⁷⁶. En esputo inducido, los niveles de MPO eran más elevados en los pacientes con asma que en sujetos controles, con lo que se demostraba que existía una degranulación de gránulos primarios en los enfermos asmáticos⁷⁷. La provocación nasal antígeno-específica, en pacientes atópicos, produjo un aumento tardío de los niveles de MPO en las secreciones de los lavados nasales, tales hallazgos no se produjeron en sujetos sanos^{78,79}. Si se estimula a los neutrófilos con partículas de Sephadex opsonizadas con suero, se encuentra que existe una mayor liberación de mieloperoxidasa en los enfermos alérgicos que en los controles⁸⁰, siendo esta liberación más intensa al final de la primavera que en épocas de no sintomatología

en enfermos polínicos⁸¹. Utilizando el mismo método de partículas opsonizadas, existe una mayor liberación de MPO si los neutrófilos se preincubaban con IL-3 (interleukina 3) y sobre todo con GM-CSF. No hubo ninguna influencia si se incubaban con IL-5 (interleukina 5)⁸². La secreción de MPO por los neutrófilos no se ve inhibida por la adición de citochalasin B, como ocurre en los eosinófilos con la proteína catiónica de los eosinófilos (ECP)⁸³.

En nuestro servicio se han realizados diversos estudios sobre la liberación de MPO por los neutrófilos. Si estimulamos estas células con fMLP, obtenemos una mayor liberación de MPO en un grupo de pacientes asmáticos sin inmunoterapia que la producida en controles sanos. En el grupo de asmáticos sin inmunoterapia, nos encontramos con una correlación negativa entre la liberación de MPO y la función pulmonar, tomada como FEV₁ (volumen máximo espirado en el primer segundo) de los pacientes. En pacientes asmáticos tratados con inmunoterapia, los neutrófilos secretan menos MPO que los no tratados con inmunoterapia, obteniéndose unos valores semejantes a los hallados en los controles sanos^{84,85}. La liberación de MPO en neutrófilos de pacientes atópicos se ve inhibida en diferentes grados, por antihistamínicos (loratadina > terfenadina > cetirizina), nedocromil sódico y corticoides (dexametasona y budesonida)⁸⁵. Por otra parte, cuando estimulamos con antígeno se produce una liberación específica de MPO, que no se observa en pacientes alérgicos no sensibles a dicho antígeno ni en sujetos sanos⁸⁶.

1.4.2.-Moléculas de adhesión:

Los neutrófilos están equipados con sensores para señales solubles, generados en los tejidos en respuesta al insulto celular, y sensores para moléculas de superficie⁸⁷. Estos receptores son los encargados de la comunicación de los neutrófilos con el exterior.

En la actualidad, está bien documentado que las moléculas CD 11b (cadena variable de las integrinas y que forma parte del receptor del complemento CR₃) y CD35 (receptor del complemento CR₁), no sólo forman parte de la superficie celular de los neutrófilos, sino que su menor o mayor expresión puede desencadenar inmunodeficiencia o alteración de la activación celular. Después de realizar el test cutáneo alérgico-específico, los neutrófilos expresan “*in situ*” mayor número de receptores de CR₃ que los de sangre periférica⁸⁸. En enfermos asmáticos, se ha demostrado un aumento de expresión del CD35 en la superficie celular de neutrófilos,

con respecto a una población sana de referencia ⁸⁹, tras provocación bronquial con antígeno, histamina y ejercicio ^{90, 91}. Así mismo, después de la estimulación “*in vitro*” de estas células con un factor activador de los neutrófilos (el factor quimiotáctico fMLP), existía un aumento en la expresión del CD 11b ⁹². La modulación de estas moléculas en los enfermos alérgicos no sólo regularía la fagocitosis de partículas opsonizadas, sino que intervendrían en la adhesión celular al permitir un determinado grado de unión a las células endoteliales vasculares y posterior migración hacia el órgano de choque (piel, mucosa nasal, vías aéreas, etc.) ^{76-86, 88, 89, 92-101}.

En los enfermos asmáticos más inestables, aquellos que tienen una variabilidad en su pico de flujo del más del 10%, existe un aumento de adhesión de los neutrófilos de sangre periférica a la selectina E que no llega a ser significativo, aunque sí lo es la adhesión a ICAM-1 ¹⁰².

En nuestro servicio se han investigado las modificaciones de las moléculas de adhesión y otros receptores de membrana: CD 11a (cadena variable α L de las β_2 , integrinas), CD 11b, CD 11c (cadena variable α X de las β_2 , integrinas), CD18, CD62L (selectina L), ICAM-1 (CD54), CD32 (receptor II de las inmunoglobulinas G: Fc γ RII) y CD16 (receptor III de las inmunoglobulinas G: Fc γ RIII) que se producen en los neutrófilos de pacientes atópicos. Cuando estimulamos con un alérgeno al cual el paciente es sensible, existe una disminución del CD62L en la superficie de los neutrófilos cuantificados, igual en porcentaje al de células positivas como en la disminución de la intensidad media de fluorescencia (IMF) ^{103,104}. No se observa ninguna modificación en los restantes receptores. Los hallazgos en el CD62L no existen en controles sanos ni en pacientes alérgicos estimulados con un antígeno al que no son sensibles. Cuando estimulamos los neutrófilos de pacientes alérgicos con anticuerpos anti-IgE observamos, como existe un aumento del CD16 y una disminución del CD62L con respecto al porcentaje de células positivas. Con respecto a la IMF, se produce un aumento de expresión del CD 11 b y CD 18, mientras que se vuelve a producir una disminución del CD62L, todo ello dependiente de la dosis de anti-IgE que se deposita en el cultivo. No se observó ninguna modificación en los restantes receptores estudiados. Se observó que el efecto de la anti-IgE era más potente que el del antígeno, ya que el número de receptores de IgE estimulados era superior al emplear el citado anticuerpo. Curiosamente, también se ha obtenido una disminución del número de CD62L tras estimulación con anti-IgE en linfocitos de pacientes alérgicos, con un aumento del CD62L soluble en el sobrenadante del cultivo. Por otra parte, la

inmunoterapia inhibe de forma significativa la cantidad de CD62L liberada de la superficie celular, por lo que actuaría frenando el paso de estas células del torrente circulatorio hacia el foco de respuesta alérgica ¹⁰⁵.

Como los resultados con el CD62 eran constantes, en cualquiera de los métodos empleados para su estudio, se prosiguió el estudio con este marcador observando que los antihistamínicos (loratadina, terfenadina y cetirizina), así como el cromoglicato disódico eran incapaces de revertir los efectos de la anti-IgE. Por el contrario, la budesonida y la dexametasona sí inhibieron la disminución de CD62L, aunque a dosis de 100 µM.

1.4.3.- Actividad quimiotáctica de los neutrófilos:

La actividad quimiotáctica de los neutrófilos inducida por PAF está aumentada en los pacientes con asma bronquial con respecto a una población sana de referencia ^{106,107}, y está relacionada inversamente con la producción por los neutrófilos de un derivado del ácido araquidónico 5-HETE ¹⁰⁷; no existen diferencias si estimulamos la quimiotaxis de los neutrófilos con histamina, sustancia P, VIP o somatostatina ¹⁰⁶. Tampoco existen diferencias si estimulamos la quimiotaxis con PAF y fMLP en pacientes con rinitis alérgica con respecto a los controles, aunque sí la hay al estimular con PAF los neutrófilos de densidades más bajas que presentan un aumento de este con respecto a los de más altas ¹⁰⁸. La teofilina inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos de pacientes asmáticos estimulada con LPS opsonizado con suero ¹⁰⁹. Por otra parte, podemos medir la actividad quimiotáctica que genera el suero o las diferentes secreciones sobre los neutrófilos, y así tenemos que la actividad quimiotáctica del suero está aumentada en los enfermos asmáticos con respecto a una población control ¹¹⁰, aumenta en enfermos asmáticos tras provocación con ejercicio ^{111, 112}, nebulización de agua destilada ¹¹² y antígeno ^{113, 114}. No existe ninguna actividad quimiotáctica aumentada del suero si efectuamos una provocación con metabisulfito ¹¹⁵. La actividad quimiotáctica de las secreciones nasales está aumentada en los enfermos con rinopatía, sin influir el hecho de que sea extrínseca o no y sin tener influencia la provocación nasal con antígeno ¹¹⁶. Sin embargo, otros autores sí han encontrado una actividad quimiotáctica elevada de las secreciones nasales tras provocación con antígeno ¹¹⁷, por la presencia del factor quimiotáctico de los neutrófilos de alto peso molecular en las mismas condiciones ¹¹⁸.

1.4.4.- Neutrófilos normo-hipodensos:

Cuando utilizamos medios de separación de neutrófilos de distintas densidades: fracción 1 (densidad > 1.085), fracción 2 ($1.081 < \text{densidad} < \text{ó} = 1.085$), fracción 3 ($1.077 < \text{densidad} < \text{ó} = 1.081$) y fracción 4 (densidad $< \text{ó} = 1.077$), se encuentra en los enfermos alérgicos un mayor número de neutrófilos hipodensos. Si comparamos la quimiotaxis de los neutrófilos inducida por el PAF y el fMLP de los enfermos con rinitis alérgica, se puede comprobar que las células que poseen menor densidad presentan una mayor capacidad quimiotáctica.

Cuando se incuban los neutrófilos con PAF y GM-CSF, aumentan las cantidades de neutrófilos hipodensos con ambas sustancias siendo el efecto del PAF inhibido al utilizar un inhibidor de los receptores del PAF¹¹⁹. Pero si analizamos esta conversión con respecto a la población normal de referencia sólo el GM-CSF convierte más cantidad de neutrófilos en hipodensos de forma significativa en los pacientes alérgicos con respecto a la población de referencia¹²⁰. Se ha indicado que los neutrófilos pueden desensibilizarse al PAF, tras la exposición a esta sustancia “*in vivo*”¹²¹, sugiriéndose que estos mecanismos podrían explicar los anteriores hallazgos “*in vitro*”¹²⁰, ya que los neutrófilos de los enfermos alérgicos estarían primados por el PAF de forma natural para tener una reacción aumentada para otras sustancias, mientras que estarían “desensibilizados” para la actuación posterior del mismo PAF.

1.4.5.- Mediadores lipídicos:

Los neutrófilos no contienen mediadores lipídicos preformados, pero pueden sintetizarlos, sobre todo PAF y LTB₄. Aunque en ciertos momentos se ha debatido, hoy está demostrado que estas células son capaces de sintetizar prostaglandinas y tromboxanos a través de la enzima ciclooxigenasa (COX)¹²²⁻¹²⁶.

Si estimulamos los neutrófilos con el ionóforo calcico A23187, observamos como unos autores no encuentran diferencias en la liberación del LTB₄ entre los pacientes asmáticos y la población normal de referencia¹²⁷. Mientras que otros autores sí encuentran diferencias estadísticamente significativas^{106, 107, 113, 122, 125, 128}. La posible explicación a estos hallazgos es que mientras los primeros analizaron pacientes sin sintomatología y con inmunoterapia¹²⁷, los segundos lo hicieron en pacientes sin inmunoterapia^{107, 113, 125, 128}. Estos últimos observan además que no se producen estas diferencias en los pacientes cuando no tienen sintomatología clínica y sí cuando la tienen (fuera y dentro de la estación polínica)¹²⁵. Las observaciones de Hosni et al¹²²

sugieren que las plaquetas pueden ejercer un papel importante en la regulación de la producción de LTB₄ por los neutrófilos. En los neutrófilos de pacientes alérgicos, las cantidades de LTB₄ eran superiores en presencia de plaquetas autólogas, pero sólo con la adición de ácido araquidónico exógeno. Las plaquetas de sujetos normales reducen la cantidad de LTB₄ liberado por los neutrófilos de ellos mismos, también en presencia de ácido araquidónico exógeno. Por otra parte, las plaquetas de los sujetos normales reducían los niveles de LTB₄ en los neutrófilos de pacientes alérgicos (en presencia o ausencia de ácido araquidónico exógeno), mientras que las plaquetas de los enfermos alérgicos no afectaban a los neutrófilos de los sujetos normales. De esta forma se prueba que las plaquetas de los sujetos normales producen un control negativo en las cantidades de LTB₄ en los neutrófilos de ambas poblaciones, mientras que las plaquetas de los sujetos alérgicos parecen haber perdido este potencial de inhibición, pudiendo incluso incrementar la capacidad de producción de LTB₄ en los enfermos alérgicos ¹²². Siguiendo con estos hallazgos el nedocromil sódico es capaz de inhibir la formación de LTB₄ en los neutrófilos de pacientes alérgicos, mientras que no lo hace en neutrófilos de los controles sanos ¹²⁸.

Con respecto a otro metabolito de la 5-lipooxigenasa existen resultados conflictivos en trabajos realizados por los mismos autores pues mientras que refieren en un trabajo que el 5-HETE libre está mas alto en los asmáticos que en los controles sanos ¹⁰⁷; en otro refieren que el 5-HETE libre, el esterificado y el total están más altos en los controles sanos que en los pacientes asmáticos ¹²⁸. Estas diferencias pueden deberse a que en el primer caso los pacientes estaban asintomáticos, mientras que en el último estaban con sintomatología. Por otra parte, sí encuentran una esterificación superior del 5-HETE en los pacientes asmáticos que en los controles sanos ¹²³.

Los niveles séricos de lyso-PAf fueron superiores en pacientes con polinosis que en un grupo control sano ¹²⁹. La acetiltransferasa del lyso-PAF (acetil-CoA) presenta más actividad en neutrófilos no estimulados de pacientes alérgicos que en controles sanos.

La COX es la enzima que metaboliza los pasos desde el ácido araquidónico hacia la formación de prostaglandinas y tromboxanos. Existen dos isoformas de COX: el tipo I (COX-1) es constitutiva y esta presente en muchas células, mientras que la del tipo II (COX-2) está ausente de forma habitual en condiciones basales, pero puede ser inducida en ciertas células por mitógenos, citoquinas y otros factores. Varios tipos celulares humanos normales (incluidos los neutrófilos), pueden expresar la forma

inducible y los eicosanoides derivados de su actuación, tras estímulos adecuados ¹²⁶. Los neutrófilos de pacientes asmáticos son capaces de sintetizarla, tras provocación “*in vitro*” con PAF, TXB₂, Hβ-PGF₂, PGF₂α, PGD₂ y PGE₂, aunque no se ha realizado su comparación con una población normal de referencia ¹³⁰.

Mediante citometría de flujo, se ha podido comprobar que a los 20 minutos de estimulación con un anticuerpo anti-IgE se produce la aparición de COX-2 intracelularmente en neutrófilos de pacientes alérgicos. También aparece esta enzima si estimulamos con antígenos a pacientes sensibilizados, mientras que no lo hacen las células de sujetos sanos ni de pacientes alérgicos no sensibles a ese alérgeno. Con una concentración de 25 µg/ml de anti-IgE nos encontramos, mediante immunoblotting, mayor presencia de COX-2 que con otros estímulos como el PMA (a 100nM) o el LPS (100 µg/ml). Tras estimulación con anti-IgE nos encontramos además en el sobrenadante un aumento de tromboxano B, y tras estímulo con antígeno específico un aumento de PGE₂ ¹³¹.

1.4.6.- Radicales tóxicos de oxígeno:

Los neutrófilos son conocidos como la mayor fuente de anión superóxido (radical superóxido O₂⁻), H₂O₂ y ácido hipocloroso (HOCl). Está bien establecido que los oxidantes pueden actuar juntamente con las proteasas neutrofílicas aumentando el grado de daño tisular ^{101, 132, 133}.

Los neutrófilos de pacientes atópicos producen más superóxido en ausencia de estímulo que los neutrófilos de sujetos no atópicos. Cuando estimulamos con el ionóforo cálcico A23187 y con el quimioatrayente fMLP sigue siendo significativa la diferencia en la producción de radicales tóxicos de oxígeno en los pacientes atópicos con respecto a la población normal de referencia ¹³³. Otros autores observan los mismos hallazgos cuando estimulan también con fMLP ^{132, 134, 135}. También se producen más radicales tóxicos de oxígeno en los neutrófilos de los enfermos asmáticos que en los controles si estimulamos con PMA ^{101,134} y con zimosan opsonizado ¹⁰¹. Esta producción de O₂⁻ es inversamente proporcional a los valores del FEV₁ ¹³⁷, a los valores del PD20-metacolina ¹³⁴ y PD20-histamina ¹³², indicativos del grado de hiperreactividad bronquial. Aún más, en pacientes que presentan un empeoramiento clínico (determinado por la presencia de ataques asmáticos), la producción de O₂⁻ es superior a la que se produce en enfermos asmáticos estables ¹³².

Por otra parte, no existen diferencias en la producción de radicales tóxicos de oxígeno entre pacientes atópicos y controles sanos si se estimulan los neutrófilos con PAF y LTB₄ solamente^{101, 137}. Pero estos dos productos priman la producción de O₂⁻ tras estimulación de neutrófilos con fMLP, más en los pacientes alérgicos que en los controles sanos. La dexametasona y la azelastina inhiben de forma más intensa esta producción en los controles sanos que en los pacientes alérgicos, lo que hablaría en favor de una mayor "resistencia" al efecto de estos medicamentos en los procesos atópicos bien por una mayor y más persistente presencia del PAF y el LTB₄ en los enfermos alérgicos o por una alteración intrínseca en ellos^{136, 138}.

Los neutrófilos del BAL de enfermos asmáticos producen más cantidad de radicales tóxicos de oxígeno que los de un grupo control sano de referencia. Las plaquetas inhiben la formación de O₂⁻ a partir de neutrófilos de controles sanos, sin embargo esto no sucedió en un paciente con asma bronquial intenso y con un aumento en su número de plaquetas, lo que sugería en opinión de los autores una anormal relación entre plaquetas y neutrófilos en algún tipo de asma¹³⁸.

Al principio del estudio sobre el estallido respiratorio^{139, 140} nuestro servicio intentó detectar la activación de los neutrófilos antígeno-dependiente investigando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)¹⁴¹, mediante la técnica de la reducción del ferricitocromo C. Pero no se observó ninguna activación por esta metodología. Previamente, por el mismo método no se había detectado tampoco activación de los neutrófilos antígeno-específico en pacientes alérgicos¹⁴². Sin embargo cuando se utilizó quimioluminiscencia dependiente de luminol, sí se obtuvo una respuesta positiva¹⁴³. Esto parecía poner en evidencia la posibilidad de estar utilizando una técnica inadecuada, de una falta de relación con el antígeno o de cualquier otro factor dependiente o no de la técnica. Analizando la bibliografía previa, Daniels et al¹⁴⁴ no pudieron detectar la producción de O₂⁻ en neutrófilos tras la estimulación con IL-8 utilizando el método del citocromo C. Lo mismo ocurrió cuando intentaron reproducir el experimento Wozniak et al¹⁴⁵, sin embargo obtuvieron una respuesta positiva cuando utilizaron la quimioluminiscencia dependiente de luminol, lo que corroboraba resultados anteriores que ya habían demostrado la producción de O₂⁻ mediante esta técnica tras estimulación "in vitro" de neutrófilos con IL-8¹⁴⁶.

Estas discrepancias entre los dos métodos se han intentado explicar por varias razones:

- Una mayor sensibilidad de la quimioluminiscencia dependiente de luminol con respecto a la reducción del citocromo C¹⁴⁵.
- Como el luminol es lipofílico, tiene la capacidad de poder penetrar dentro de las células, detectando la producción de O₂⁻ extracelular e intracelularmente. Mientras la técnica de reducción del citocromo C podría detectar sólo la producción de O₂⁻ intracelular.
- Los dos ensayos poseen una especificidad distinta. Mientras que la reducción del citocromo C es específico para la producción de O₂⁻ y por lo tanto refleja la actividad de la NADPH-oxidasa de forma exclusiva. El luminol, por su parte, puede ser oxidado por muy diferentes radicales de oxígeno y oxidantes, lo que puede reflejar la actividad de otras enzimas generadoras de radicales¹⁵⁷. Así, Wang et al han demostrado que el óxido nítrico, producido por la sintetasa del óxido nítrico, aumenta la luminiscencia dependiente de luminol^{148, 149}.

Pudimos comprobar, por el método del luminol, que la provocación “*in vitro*” de neutrófilos de pacientes alérgicos con el antígeno responsable del cuadro clínico conduce a un aumento del estallido respiratorio de dichas células. Este estallido depende directamente de la concentración del antígeno y del tiempo en que actúe. La activación es específica ya que no se produce cuando añadimos un antígeno al cual el paciente no es sensible y si empleamos células de controles sanos^{139,140}. Tras la estimulación con el antígeno, hemos observado como los dos componentes citoplasmáticos de la NADPH oxidasa, p47 y p67, se incorporan a la membrana celular para formar la NDPH oxidasa de forma activa. En este modelo, la estimulación del estallido respiratorio antígeno-específica en pacientes alérgicos se ve inhibida si añadimos antihistamínicos (loratadina, terfenadina, cetirizina y cariebastina), nedocromil sódico y corticoides (budesonida y dexametasona)⁸⁵. Por otra parte, hemos podido demostrar que uno de los posibles mecanismos de la acción bactericida de ciertas quinolonas como el norfloxacino y el ofloxacino, es debido al aumento de producción de ROS, a través de la estimulación de la NDPH oxidasa, en macrófagos y neutrófilos.

1.4.7.- Síntesis y secreción de nuevas proteínas por los neutrófilos:

Hace algunos años se pensaba que los neutrófilos eran "células terminales", que no podían sintetizar ningún tipo de sustancia. Esto venía además avalado por el hecho de que estas células poseen poca cantidad de ribosomas y de ácido ribonucleico (ARN).

Pero se ha descubierto como son capaces de sintetizar una amplia variedad de proteínas que pueden aumentar la actividad preexistente de los neutrófilos o pueden aumentar la presencia y actividad de células inflamatorias¹⁵⁰.

a) La interleukina 8 (IL-8) es un potente quimioatrayente y activador de los neutrófilos. En los pulmones, la IL-8 parece ser el primer quimioatrayente para estas células. Aunque la IL-8 puede ser producida por varios tipos celulares, también puede ser sintetizada por los neutrófilos en respuesta a varios mediadores inflamatorios. De esa manera, la producción de IL-8 por los neutrófilos puede contribuir a un reclutamiento adicional de neutrófilos y puede aumentar o prolongar la activación de los neutrófilos de una forma autocrina¹⁵¹.

En esputos inducidos, existe un aumento de IL-8 en pacientes con asma en relación con una población control⁴¹. También hay un aumento de IL-8 en el BAL y en el aspirado traqueal de pacientes asmáticos^{152, 153}. Tras estímulo antígeno-específico, existe una mayor liberación, igual nasal que bronquial, de IL-8^{154, 155}.

Mediante un estímulo IgE-dependiente, no sólo hemos comprobado que se libera IL-8 de los neutrófilos de pacientes atópicos, sino que se estimula su síntesis observándose un aumento de la expresión del ARNm. Todo ello se lleva a cabo, por un mecanismo dependiente del eje Ca^{2+} -calmodulina-calcineurina y con la estimulación del factor nuclear κB (NF- κB)¹⁵⁶. Los antihistamínicos (loratadina > terfenadina > cetirizina) y los corticoides (budesonida y dexametasona) son capaces de inhibir la producción de IL-8 liberada por los neutrófilos de pacientes alérgicos tras un estímulo IgE-dependiente⁸⁵.

b) La ECP fue originariamente un componente originado en los gránulos de los eosinófilos. La ECP es una molécula multipotente con actividades citotóxicas y no citotóxicas. Su mecanismo citotóxico se basa al parecer en su capacidad de formar canales en las membranas celulares, esto permite el paso de agua y pequeños iones conduciendo a un mecanismo lítico osmótico de las células. Ello sugiere que la ECP pertenece a la familia de las proteínas formadoras de poros.

Basados en los experimentos “*in vitro*”, se postuló su importancia en los procesos “*in vivo*”, en los cuales la ECP actuaría conjuntamente con otras proteínas citotóxicas del eosinófilo y con radicales tóxicos de oxígeno. Así, la ECP se ha podido detectar mediante técnicas inmunohistoquímicas en tejidos lesionados de varios procesos patológicos humanos entre los que se encuentra el asma¹⁵⁷.

Probablemente los efectos no citotóxicos de la ECP sean incluso más importantes en los procesos “*in vivo*”, ya que ocurren a concentraciones mucho más bajas que los citotóxicos. Las actividades no citotóxicas de la ECP van directamente en contra de células como fibroblastos, células epiteliales, basófilos y linfocitos T.

Los efectos en fibroblastos incluyen una alteración en la liberación de proteoglicanos y la subsecuente acumulación intracelular de dichos productos.¹⁵⁸.

Los efectos no citotóxicos de la ECP en las células epiteliales del árbol respiratorio inducen un aumento de secreción de moco por estas células¹⁵⁹. La ECP causa la liberación de histamina y triptasa de los mastocitos del corazón, así como de histamina de basófilos humanos^{159, 160}.

En los linfocitos T inhiben la proliferación en respuesta a mitógenos y a la reacción mixta de leucocitos, regulando las respuestas mediadas por los linfocitos T¹⁶¹.

El aumento de cantidades de ECP en el lavado broncoalveolar se ha asociado con la reacción asmática tardía¹⁶² después de una provocación bronquial antígeno específica, así como en pacientes atópicos tras una exposición natural al antígeno. Los niveles de ECP en el BAL de enfermos asmáticos, en condiciones basales, se incrementó en aquellos que fueron ocasionalmente tratados con broncodilatadores pero no en pacientes regularmente tratados con corticoides inhalados¹⁶³. Se ha encontrado una correlación positiva entre niveles de ECP en BAL y la severidad del asma¹⁶⁴⁻¹⁶⁵. Resultados dispares se han encontrado con respecto a la ECP y la hiperreactividad bronquial. Ferguson et al¹⁶⁷ demostró una correlación inversa entre la respuesta bronquial a histamina y los eosinófilos, pero no con la ECP en BAL, mientras Aalbers¹⁶⁸ y Oddera¹⁶⁹ demostraron una correlación inversa entre el contenido de ECP en BAL y el PD20 con ácaros y el PD20 con metacolina respectivamente.

En comparación con controles sanos, Fahy et al¹⁷⁰ demostraron un aumento en los niveles de ECP en esputo inducido de enfermos asmáticos. Tras un test de provocación bronquial con alérgeno, en enfermos con un asma moderada, se produce un incremento marcado en los niveles de ECP en esputo inducido obtenido a las 4h y a las 24h tras provocación.

En los asmáticos los niveles de ECP en esputo se correlacionan con los niveles séricos de ECP, porcentaje de eosinófilos¹⁷¹, hiperreactividad bronquial^{172, 173}, función pulmonar y el score de síntomas¹⁷³⁻¹⁷⁵. Los niveles de ECP son marcadamente más elevados en esputo que en el BAL, siendo la correlación entre los niveles de ECP en esputo y en el BAL muy pobres^{176, 177}. Los niveles de ECP en esputo se redujeron

significativamente en asmáticos, después del tratamiento con prednisona ^{171, 178}, así como en niños tras tratamiento con corticoides inhalados ¹⁷⁹.

Se han hallado niveles aumentados de ECP en el fluido del lavado nasal durante la exposición natural antigénica en pacientes con rinitis producida por pólenes ¹⁸⁰⁻¹⁸², rinitis alérgica perenne ¹⁸³ y después de una provocación alérgica de pacientes con rinitis alérgica estacional después de la época de los síntomas ¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. El análisis de la cinética de producción de la ECP después de la provocación antigénica, demuestra que se produce en la fase tardía (3-24 h post provocación) de la reacción alérgica ^{184, 186, 187}. Tras tratamiento de corticoides tópicos, se produce una inhibición en la acumulación de la ECP ^{180, 184, 188, 189}. Konno et al ¹⁸⁸ demostraron una correlación entre el grado de mejoría de la hiperreactividad nasal a la histamina y el cambio en los niveles de ECP después de la terapia.

Los resultados de los estudios de la ECP en suero de pacientes asmáticos indican que los niveles se relacionan con la severidad de la enfermedad asmática, medida por la función pulmonar (PEAK-FLOW, FEV₁, etc), la sensibilidad a la histamina o metacolina, la propensión a desarrollar una reacción asmática tardía y la propensión a desarrollar asma inducida por el ejercicio ¹⁹⁰. Se ha demostrado en algunos estudios, que niveles altos de ECP en suero en ausencia de un tratamiento adecuado, predice la aparición de una exacerbación aguda ¹⁹¹. También se ha relacionado con el grado de exposición al alérgeno, pues cuando esta sube lo hacen también los niveles de ECP, y cuando aquella baja sucede igual con la ECP. Curiosamente, estos estudios han demostrado que el conteo en el número de eosinófilos no tiene valor y si las medidas de ECP ¹⁹²⁻¹⁹⁴.

Como su propio nombre indica la ECP se ha relacionado siempre con la actividad del eosinófilo ¹⁹⁵. Pero se ha demostrado como la ECP también existe en los neutrófilos ¹⁹⁶⁻¹⁹⁷. Por otra parte, la estimulación de los eosinófilos por un mecanismo IgE dependiente, no ha conseguido producir activación de dichas células ni liberación de sus componentes ¹⁹⁸. Más específicamente, la estimulación IgE dependiente del eosinófilo no provoca la liberación de la ECP por dichas células ¹⁹⁹.

Como hemos podido observar, la ECP la podemos hallar en el interior de los neutrófilos bien sea mediante microscopía de fluorescencia, como por citometría de Flujo, y la liberación de la ECP podemos comprobarla mediante análisis por la técnica ELISA, como por immunoblotting. La liberación de la ECP por los neutrófilos se realiza óptimamente a las 18 horas de cultivo de estas células con el agonista. Se

produce con el antígeno al que el paciente es sensible y no se produce con el antígeno al cual el paciente no es sensible o en individuos sanos de referencia. Con la anti-IgE se produce una liberación mayor que con el antígeno, el PAF también induce la liberación de ECP y conjuntamente el PAF con la anti-IgE inducen una mayor liberación de ECP.

Nuestro equipo de investigación ha demostrado como la ECP es liberada por el neutrófilo por un mecanismo IgE-dependiente, que es específico ya que sólo se produce la liberación con el alérgeno al cual los pacientes son sensibles.

Curiosamente, el PAF es capaz de liberar ECP en los neutrófilos “*per se*”, mientras que no sucede esto mismo en los eosinófilos ya que es incapaz de liberar cantidades apreciables cuando actúa sólo, necesitando la colaboración de otras sustancias antes de actuar él mismo.

1.4.8.- Metabolismo del Ca^{2+} y otros procesos intracelulares:

Según algunos autores, la estimulación de neutrófilos con PAF y LTB_4 no originó diferencias significativas en el aumento de Ca^{2+} intracelular en los neutrófilos de enfermos alérgicos con respecto a los de los controles sanos ¹⁰¹. Sin embargo, nosotros pudimos comprobar que existía un aumento del Ca^{2+} intracelular cuando estimulábamos con antígeno y además, al estimular con anti-IgE el ascenso del Ca^{2+} intracelular era superior en las células de los pacientes alérgicos que en las de los sujetos sanos ¹³⁹.

En nuestro modelo celular, la inhibición del flujo de Ca^{2+} a los neutrófilos de pacientes alérgicos inhibía la liberación de IL-8, la producción de ARNm y la activación del NF- κ B, por lo que el Ca^{2+} , no sólo interviene en la liberación de IL-8, sino también en su síntesis. La calmodulina es una enzima que está implicada en muchos mecanismos del desarrollo de la respuesta celular en general, activando la función de varias cinasas (CaM cinasa I y II, cinasa de las cadenas ligeras de la miosina), fosfatasas (calcineurina), canales iónicos (bomba Ca^{2+} de la membrana plasmática) y otras enzimas citosólicas, tales como fosfodiesterasa, adenilciclasa y óxido nítrico sintetasa. Por ese motivo, no es sorprendente que los inhibidores de la calmodulina inhiban procesos de activación celular como el estallido respiratorio, el aumento de expresión del Mac-1, la migración celular, la motilidad celular y, en nuestro caso, la liberación IgE-dependiente de la IL-8.

Por otra parte, la calcineurina es otra enzima con una función primordial en la cascada de transducción de señales que conlleva la activación celular, siendo un factor regulador de factores de transcripción tales como NF-AT, NF- κ B y AP-1, que están

involucrados en la expresión de un importante número de genes, como pueden ser el de la IL-2, el TNF- α , etc ²⁰⁰. La presencia de calcineurina en los neutrófilos se había adivinado por mecanismos indirectos; nuestro servicio ha demostrado por primera vez la actividad de esta enzima en neutrófilos humanos ²⁰¹ y cómo era regulada por Ca^{2+} y por ROS. La ciclosporina (CsA) es un fármaco inmunosupresor que se une específicamente a la inmunofilina e interfiere en la activación de la calcineurina. Nuestro servicio ha presentado evidencias de que la CsA inhibe, de manera dosis-dependiente, la producción de IL-8, la expresión de ARNm para la IL-8 y la formación de complejos de NF- κ B. Se ha sugerido que el factor de transcripción NF-AT puede estar involucrado en la producción de IL-8 por los neutrófilos, pero hasta el momento no hemos podido encontrar ninguna actividad NF-AT en el ADN de los extractos nucleares de los neutrófilos ²⁰¹.

Se han descrito varias isoformas de la proteincinasa C (PKC) y se han clasificado en tres grupos basados en su estructura y en los cofactores que las regulan. Las mejores caracterizadas son las que se describieron primeramente y que son las PKC convencionales (cPKC), entre las que se incluyen: PKC- α , PKC- β I, PKC- β II y PKC- γ , que necesitan para su activación de la fosfatidilserina y se activan por Ca^{2+} y diacilglicerol. Las nuevas PKC, como son: PKC- δ , PKC- ϵ , PKC- ν , PKC- θ y la PKC- μ , también necesitan de la fosfatidilserina y del diacilglicerol, pero son independientes del Ca^{2+} y son estructuralmente similares a las PKC convencionales. Y por último, las PKC atípicas, como la PKC- ζ y la PKC105, que requieren fosfatidilserina pero son diacilglicerol y Ca^{2+} independientes, siendo diferentes estructuralmente de las otras dos subclases. En nuestro servicio no sólo se ha comprobado que la regulación del CD62L es mediado por la activación de la PKC, sino que tras una activación IgE-mediada de los neutrófilos de pacientes alérgicos se activan las subunidades: PKC- β I, PKC- β II, PKC- δ , PKC- γ , PKC- ζ . ²⁰².

1.5. LACTOFERRINA

1.5.1.-Generalidades:

El nombre de lactoferrina deriva de su antigua clasificación como una proteína fijadora de hierro mayoritaria en la leche.

De las tres proteínas con afinidad por el hierro: transferrina, ferritina y lactoferrina, esta última se revela cada vez más como una pieza fundamental en los acontecimientos fisiopatológicos ligados a la infección e inflamación, constituyendo el nexo de unión entre el incremento del turnover leucocitario y el atrapamiento de hierro en el sistema fagocítico-mononuclear.

La lactoferrina, también llamada lactotransferrina, es una proteína transportadora de hierro, que se encuentra presente en las granulaciones específicas o secundarias de los granulocitos polimorfonucleares. Fue descubierta por primera vez en la leche bovina por Sorensen y Sorensen en 1939²⁰³, y en 1960 se aisló en la leche humana por Johansson²⁰⁴. Posteriormente, la obtención de antiseros específicos hizo posible su detección en otros fluidos corporales tales como la lágrima, saliva, secreciones nasales y bronquiales, bilis, orina, semen y moco cervical. Masson et al en 1969²⁰⁵, utilizando aminoácidos marcados, demostraron su síntesis activa por los granulocitos neutrófilos de la médula ósea. Por otra parte, el uso de anticuerpos anti-lactoferrina marcados con fluoresceína, reveló una brillante fluorescencia citoplasmática en metamielocitos y neutrófilos maduros, y débil tinción en elementos más inmaduros. Poco después, en 1970, Baggiolini et al²⁰⁶, mediante estudios de fraccionamiento celular, encontraron que la lactoferrina se localiza en las granulaciones secundarias o específicas del neutrófilo de conejo. Esto mismo fue demostrado en neutrófilos humanos por Spitznagel et al en 1974²⁰⁷.

Sintetizada por los neutrófilos como proteína de acúmulo intracelular, en condiciones fisiológicas es liberada al medio extracelular en muy pequeñas cantidades, encontrando amplias diferencias según los diversos autores, siendo para Hansen et al²⁰⁸ de 0.13-0.42 mg/l, y para Olofsson et al²⁰⁹ de 0.40-2.64 mg/l.

Como ya se ha mencionado se encuentra en la práctica totalidad de las secreciones corporales, predominantemente en las secreciones de las glándulas exocrinas digestivas, respiratorias y reproductivas, sugiriéndose en un principio un rol en la defensa inespecífica contra patógenos invasivos.

1.5.2.- Estructura y Propiedades:

Se trata de una glucoproteína de 703 aminoácidos, de Pm entre 75 y 80 kDa y con un punto del isoelectrico de 8.7, que transporta reversiblemente dos iones Fe^{3+} por molécula ²¹⁰⁻²¹⁵.

La estructura terciaria de la hololactoferrina consiste en una sola cadena polipeptídica plegada en dos lóbulos llamados N- y C-lóbulo cada uno con un sitio fijador de hierro ²¹⁶, que se corresponden con los radicales amino terminal (residuos 1-333) y carboxilo terminal (residuos 345-692) respectivamente, la secuencia 334-344 representa la llamada bisagra, se trata de tres α -hélices que cumple su rol durante la apertura y cierre de los dominios, de manera que pequeños ajustes internos puedan permitir la acomodación del hierro y aniones sin alterar la estructura molecular general ²¹⁷.

Cada lóbulo es subdividido en dos dominios N1, N2 (N-lóbulo) y C1, C2 (C-lóbulo), con un sitio fijador de hierro situado en la cara interna de la hendidura interdominio ²¹⁸, **Figura 2**. La fijación de hierro (Fe^{3+}) por la lactoferrina ocurre concomitantemente con la vinculación de dos aniones de bicarbonato, un proceso esencial para ligar el hierro a la lactoferrina ²¹⁹ y los aminoácidos que contribuyen a la fijación del hierro en la hendidura son 2 tirosinas, 1 aspartato y 1 histidina ^{217, 218}. El papel del anión carbonato parece ser doble: (a) neutralizar cargas positivas que podrían rechazar el catión, y (b) preparar el sitio fijador del metal en la apo-proteína agregando dos ligandos más potentes ²¹³. Como resultado de la fijación del hierro se produce el cierre de la hendidura inter-dominio.

Hay una notable homología entre los dos lóbulos (los aminoácidos 1-333 y 345-692, respectivamente). Se han demostrado 125 (37 %) aminoácido idénticos en los respectivos lóbulos y muestran una estructura terciaria muy similar. Esto ha llevado a una teoría de duplicación del gen, que podría haber ocurrido hace unos 500 millones de años cuando la molécula original de 40 kDa se reprodujo, mientras formaba los dos dominios y dando lugar así a una familia de proteínas con una masa molecular de 80 kDa ²¹¹.

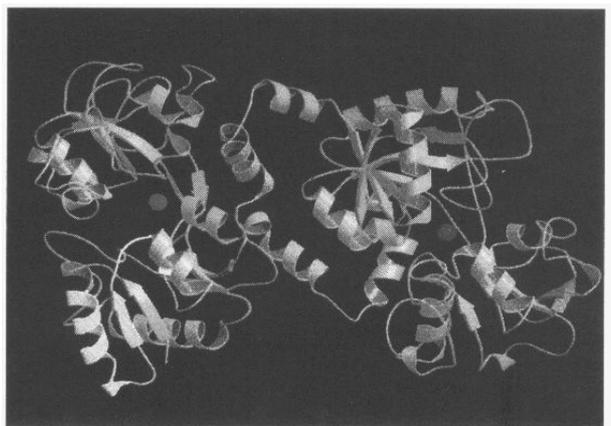


Figura 2: Estructura terciaria de la hololactoferrina.

La secuencia de la lactoferrina humana ha sido estudiada en diferentes fuentes de lactoferrina: la primera secuencia de aminoácidos se realizó en la lactoferrina de la leche materna y la secuencia del ADNc en células mieloides y glándulas mamarias. Estas secuencias fueron prácticamente idénticas, sin embargo, la estructura cristalográfica de las diferentes lactoferrinas humanas sugieren que son tres residuos de argininas (GRRRS), y no cuatro (GRRRRS), los presentes en el extremo N-terminal de la proteína. Esta discrepancia es consecuencia de la flexibilidad de la proteína en su N-terminal y por ello la densidad en este punto es ambigua ²¹⁷.

Los estudios de cristalografía también han mostrado los cambios conformacionales una vez fijado el hierro en la lactoferrina y transferrina ²¹³. La afinidad fijadora de hierro y las características de los lóbulos se han estudiado bien en la transferrina ²²⁰, pero es menos conocido en la lactoferrina. La transferrina puede existir en cualquiera de estas cuatro formas moleculares ^{213, 221, 222}: apotransferrina, transferrina monoférrica, en sus formas-A ó -B, y transferrina diférrica. Cuando el grado de saturación férrica aumenta, la masa molecular de la transferrina disminuye, implicando que el hierro fijado a las áreas fijadoras de la transferrina inducen un cambio conformacional que conduce a cerrar un dominio fijador de hierro. La separación de tres formas de lactoferrina ha sido también representada con éxito usando cromatografía líquida de alto rendimiento, pero la certeza absoluta sobre la existencia de cuatro formas fijadoras de hierro de lactoferrina aún no se ha logrado, ya que la diferenciación entre posibles formas-A y B de lactoferrina monoférricas por electroforesis no se ha llevado a cabo ²²³.

El análisis estructural por Rayos-X ha revelado la estructura espacial de la lactoferrina ²¹⁸, **Figura 3**. La estructura terciaria de la apolactoferrina y hololactoferrina

son diferentes, y las diferencias principalmente se centran en el N-lóbulo. El N-lóbulo de la apolactoferrina tiene una conformación abierta (un ángulo de 53° entre los N1 y N2 subdominios), y el C-lóbulo tiene una conformación cerrada (los C1- y C2-subdominios se acercan). En la hololactoferrina, ambos lóbulos muestran una conformación cerrada ²¹⁸.

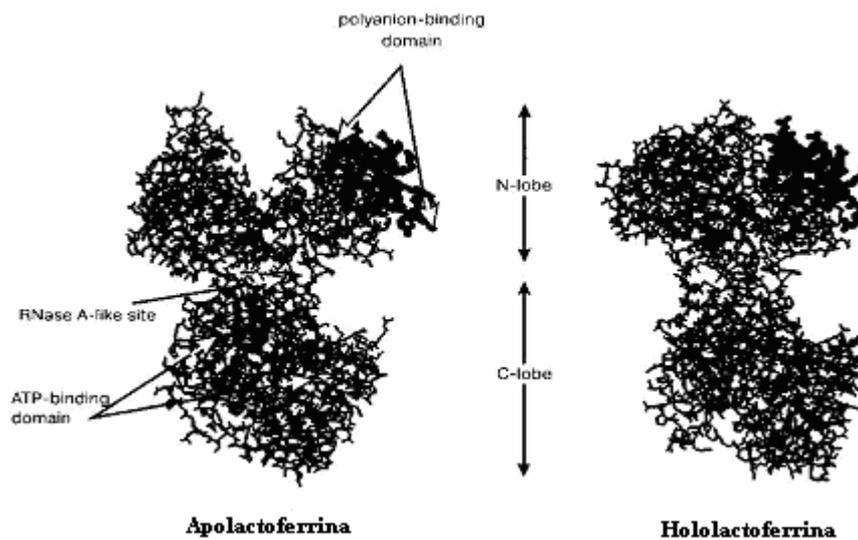


Figura 3: Estructura espacial por Rayos-X de la apolactoferrina y hololactoferrina.

La lactoferrina puede existir en tres isoformas ²¹², dos con actividad RNasa (lactoferrina- β y lactoferrina- γ) y una sin actividad RNasa (lactoferrina- α), las tres están presentes en la leche del pecho humana y en los granulocitos ^{212, 224}. Estas isoformas comparten la misma física, química y características antigénicas, pero difieren en sus propiedades funcionales. Las isoformas con actividad RNasa no muestran funciones hierro-fijadoras, mientras que la isoforma fijadora de hierro no tiene ninguna actividad RNasa ²¹². Estos resultados pueden explicar parcialmente la diversidad de informaciones sobre las funciones atribuidas a la lactoferrina.

La lactoferrina de la leche humana tiene dos puntos potenciales de glicosilación (la asparragina 137 y 478, una localizada en el extremo-C- y el otro en el extremo N-terminal); sin embargo, el grado de glicosilación varía (y por tanto la masa molecular de la proteína puede oscilar entre 76 y 80 kD). No obstante, los residuos de glicósidos presentes en la lactoferrina son característicos ²¹⁸. Los azúcares encontrados son glicanos poli-N-acetilactosamínicos, que contienen ácido N-acetneuramínico, galactosa y fucosa ^{210, 211}. La estructura primaria de los glicanos de la lactoferrina de los polimorfonucleares

neutrófilos humanos (PMN) es idéntico al de los glicanos de la lactoferrina de la leche humana. Van Berkel et al ²²⁵ demostraron que la alta resistencia de la lactoferrina frente a proteasa, bajadas del pH, etc..., podría ser debida a la alta glicosilación. Pero el papel preciso de estos glicanos no se ha establecido, y se dice que su eliminación no tiene un efecto claro en la función y propiedades de la lactoferrina, tales como la fijación al receptor ^{219, 226}. Sin embargo, esta afirmación se ha discutido en algunos estudios donde fueron implicados como ligandos del receptor ²²⁷.

La lactoferrina es notablemente resistente a la degradación proteolítica por la tripsina y enzimas similares a la tripsina, dándole una resistencia parcial por lo menos a la digestión en el intestino ²¹⁹. Esta propiedad facilita la absorción neonatal de la lactoferrina de la leche materna. Es interesante que la forma hierro-saturada (la hololactoferrina) sea más resistente a la proteólisis que la apoforma ²²⁸. El grado de lactoferrina saturada de hierro en el plasma es desconocida ²²⁹.

Las similitudes entre la lactoferrina y otras transferrinas son pronunciadas. El mismo modelo de polipéptidos plegados se encuentra en todos los miembros de la familia de las transferrinas ^{211, 213}. La lactoferrina, como la transferrina, es un transportador férrico y como tal existen la hololactoferrina (hierro-saturadas) y apolactoferrina (hierro-vacía). La masa molecular de la transferrina (la apo-forma: 75-76.6 kDa; la holo-forma: 73.8-86 kDa) está dentro del rango conocido de la lactoferrina (la apo-forma: 75-76.4 kDa; la holo-forma: 82.6 kDa) ²¹⁴. La composición de aminoácidos de la lactoferrina y transferrina parece ser muy similar ^{214, 230}, con un 49%-59% de homología entre los dos dominios correspondientes de las respectivas moléculas ²¹⁰. La estructura secundaria, incluyendo sus uniones disulfúricas entre residuos de cisteína ²¹⁵, así como la terciaria es notablemente similar. Estos resultados han llevado a especular que las dos moléculas pueden compartir el mismo origen filogenético ²¹⁵.

Pero la lactoferrina, sin embargo, difiere de la transferrina en sus propiedades inmunológicas o antigénicas, composición de hidratos de carbono (los glicósidos de la lactoferrina contienen un residuo de fucosa terminal), la solubilidad en agua, punto isoeléctrico (la lactoferrina es más básica que la transferrina, pI 8,7 y 5,9 respectivamente), localización del hierro fijado y sitios de glicosilación (los puntos de glicosilación en la transferrina están localizados en el lóbulo-C, mientras cada lóbulo (-C y -N) de la lactoferrina tiene un sitio de glicosilación) ^{211, 212, 231}. Por tanto pese a sus similitudes conviene enfatizar algunas diferencias entre ambas, que pueden tener un notable significado biológico:

- a) No se ha evidenciado reactividad inmunológica cruzada entre transferrina y lactoferrina de la misma especie, debido probablemente a mínimas variaciones entre sus determinantes antigénicos. Esto facilita la identificación y cuantificación de ambas por métodos inmunológicos en fluidos corporales.
- b) A pH ácido, por debajo del fisiológico, la transferrina pierde su afinidad por el hierro, en tanto que la lactoferrina sigue conservándola. Esto hace que en un foco inflamatorio, donde el pH es ácido por la alta concentración de productos catabólicos, esté favorecido el trasvase de dicho metal desde la transferrina hacia la apo-lactoferrina liberada por los neutrófilos al medio extracelular durante la fagocitosis. De esta forma, la reacción:

$$\text{Transferrina-Fe}_2 + \text{apo-lactoferrina} \leftrightarrow \text{apo-transferrina} + \text{lactoferrina-Fe}_2$$

está permanentemente desplazada hacia la derecha.

- c) La lactoferrina tiene un turnover más rápido que la transferrina. Esto le confiere gran importancia en la cinética del hierro en procesos infecciosos. En este sentido, Bennett y Kokocinski ²³², demostraron que la lactoferrina saturada con hierro, no en su forma libre (apo-lactoferrina), tras marcarla con isótopos radiactivos, experimentó un rápido aclaramiento plasmático, que se acompañó de una rápida captación en hígado y bazo. La radiactividad persistió varias semanas en estos órganos, desde donde fue transferida lentamente a la médula ósea antes de aparecer en eritrocitos circulantes.
- d) Las células del sistema fagocítico-mononuclear poseen receptores de membrana específicos, no sólo para la transferrina ²³³, sino también para la lactoferrina, siendo la afinidad de ésta por aquellos mucho mayor cuando se encuentra saturada de hierro que en su forma libre ²³⁴.
- e) El péptido conector interlobular es helicoidal en la lactoferrina, mientras que en la transferrina es irregular.

1.5.3.- Niveles de lactoferrina en plasma:

La lactoferrina está presente en el plasma a concentraciones relativamente bajas, comparadas con los niveles substancialmente más altos encontrados en el calostro, leche materna, y el plasma seminal. Las diferencias obtenidas en su determinación son probablemente atribuibles a factores como:

- 1) Los métodos analíticos.
- 2) El tipo de anticoagulante usado.

- 3) Las variaciones en la saturación férrica de la lactoferrina. Se ha visto como ciertas formas de lactoferrina tienen una afinidad más alta por sus receptores. La afinidad por el receptor quizás podría atribuirse a los cambios conformacionales que ocurren cuando liga hierro.
- 4) El estado de la lactoferrina “*in vivo*” comparado con el polimerizado “*in vitro*”^{235, 236}. La molécula exhibe una pronunciada tendencia al polimerizado lo que posiblemente puede contribuir a aumentar la amplia gama de niveles de lactoferrina en suero.
- 5) El intervalo de tiempo entre la venopunción y el análisis.

La lactoferrina del plasma deriva predominantemente de los neutrófilos²¹⁹. Su presencia en los gránulos específicos se usa a menudo para identificar estos gránulos. Sin embargo, resultados recientes han mostrado que la lactoferrina también se encuentra en otros gránulos, probablemente terciarios, aunque a bajas concentraciones²³⁷. Las concentraciones de lactoferrina en plasma pueden o no pueden correlacionarse con el conteo de neutrófilos^{208, 238, 239}, dependiendo de la magnitud de la degranulación y quizás la contribución de otros órganos, como la médula ósea, endometrio y placenta, en la captación de lactoferrina plasmática²⁴⁰⁻²⁴².

Varios autores han notificado que los niveles de lactoferrina son más altos en los varones que en las mujeres^{229, 243-245}; uno informó que los niveles eran similares, pero con desviaciones estándar mayores para las mujeres²²⁸, y solo uno informó de niveles más altos en las mujeres que en los varones²⁴⁶. En vista del mayor volumen de granulocitos con lactoferrina encontrado en los hombres por Freeman et al.²⁴⁷, es probable que el nivel más alto encontrado en varones por la mayoría de los autores sea consecuencia de su degranulación en mayor o menor grado.

Los niveles de lactoferrina en plasma cambian durante el embarazo. Los cambios en los niveles de lactoferrina del plasma maternal se manifiestan con un ascenso progresivo en la concentración, estabilizándose en la semana 29 del embarazo²⁴⁴. Varios factores pueden contribuir a esto: (a) la leucocitosis asociada al embarazo²⁴⁸; (b) el aumento selectivo de lactoferrina en el volumen granular de neutrófilos, mientras el contenido de mieloperoxidasa se mantiene igual²⁴⁹; (c) la contribución a los niveles plasmáticos maternos de la lactoferrina derivada de la decidua²⁴² y, quizás, (d) una influencia hormonal en la producción de lactoferrina por otros tejidos como el endometrio, decidua o acino del pecho²⁵⁰. Por tanto parece que los niveles de

lactoferrina pueden influenciarse por la actividad endocrina. Tal influencia hormonal explica y se basa en los siguientes hechos: (a) la desviación estándar mayor vista en el suero de las mujeres ²²⁸, (b) la sugestiva producción endometrial de lactoferrina durante la fase secretoria del ciclo menstrual ²⁴¹, (c) el aumento en los niveles plasmáticos durante el embarazo ²⁴⁴, (d) la correlación entre el conteo de neutrófilos y los niveles de estradiol urinario ²⁵¹, (e) niveles más altos postmenstruales que premenstruales en la mucosidad vaginal ²⁵², (f) la disminución en los niveles de lactoferrina vaginales máximos encontrados en las mujeres con anticonceptivos orales ²⁵², (g) la tendencia conocida de los niveles plasmáticos de lactoferrina para variar con el ciclo menstrual ²⁵³, (h) las diferencias entre los niveles de varón y mujeres, (i) la dependencia hormonal de la concentración de lactoferrina prostática ²⁵⁴, y (j) los niveles de plasma postmenopáusicos más altos ^{228, 245}.

1.5.4.- Metabolismo de la lactoferrina:

La lactoferrina se produce y almacena en los neutrófilos, libre de hierro, a nivel de los gránulos específicos ^{218, 255}.

Parece ser, como ya hemos comentado, que los niveles de producción de lactoferrina son hormono-dependientes. Se piensa que la regulación de la producción de la lactoferrina depende del tipo de célula productora. Por ejemplo, los estrógenos regulan la expresión de lactoferrina en los tejidos del tracto reproductor, pero no influyen en la producción de lactoferrina por las células de las glándulas mamarias; en cambio la prolactina estimula la producción de lactoferrina en las glándulas mamarias durante la lactancia.

La lactoferrina almacenada en los gránulos específicos de los neutrófilos tiene dos destinos: o puede secretarse en los tejidos circundantes o sangre ²⁵⁵, o los gránulos pueden fundirse con el fagosoma ²⁵⁶. La secreción a la circulación depende de factores de degranulación que a su vez parecen ser dependientes de la activación de la guanilciclase (cGMP) y de la PKC (calcio dependiente). Esto ocurre en condiciones aeróbicas y anaerobias y se estimula por la IL-8 y la IgG unida a la superficie ^{256, 257}.

Los niveles plasmáticos de lactoferrina generalmente aumentan en sobrecarga de hierro, inflamación, enfermedades infecciosas, y durante el desarrollo de un tumor, demostrándose un mecanismo de estimulación multifactorial para la liberación de la lactoferrina de los neutrófilos²⁵⁸.

En su liberación, la lactoferrina liga iones de metal, siendo el hierro el más estudiado. La relación precisa de apo/hololactoferrina en suero no ha sido todavía determinada, porque tales determinaciones tienen ciertas dificultades experimentales. La lactoferrina es eliminada de la circulación de una de estas dos maneras fundamentalmente:

- Puede eliminarse tanto de la circulación como de los espacios intersticiales a través de un mecanismo de endocitosis receptor-mediado por las células fagocíticas (macrófagos, monocitos y otras células del RES), con el traslado subsiguiente del hierro a la ferritina^{209, 234, 255}. En experimentos realizados con ratas, la vida media de la hololactoferrina inyectada se prolongó el triple al bloquear el RES²⁵⁵. Alguna controversia existe todavía con respecto a las células involucradas en esta forma de eliminación de la lactoferrina²⁵⁹.

- La manera alternativa de eliminación de la lactoferrina sería su captación directa por el hígado. Las células de Kupffer y el endotelio del hígado, así como los hepatocitos parecen estar involucrados en ello existiendo al parecer una captación competitiva con la transferrina²⁶⁰.

Bennet y Kokocinski mostraron que la lactoferrina marcada se aclara rápidamente de la circulación por el hígado y bazo. Con todo la lactoferrina no desapareció hasta 7 horas después de la inyección²³². No es todavía seguro que la lactoferrina, como la transferrina, se recicle²⁶¹. Se necesita una investigación más extensa para entender el metabolismo de la lactoferrina totalmente.

Los riñones también parecen jugar su papel en la eliminación de la lactoferrina de la circulación ya que se ha encontrado lactoferrina y fragmentos de lactoferrina en la orina de lactantes²⁶². Es interesante conocer que la lactoferrina encontrada en los lactantes alimentados con pecho es predominantemente de origen maternal²⁶². También se han encontrado fragmentos moleculares de lactoferrina en las deposiciones²⁶³.

1.5.5.- Receptores de la lactoferrina:

La lactoferrina es una proteína básica con un punto isoelectrico alto (8.7), permitiéndole sufrir uniones inespecíficas a muchas células diana o proteínas²¹³.

Algunos estudios con fragmentos de lactoferrina indican que el lóbulo-N (de residuos 1-90) está involucrado en la fijación al receptor de la lactoferrina ²⁶⁴. Sin embargo otros estudios encontraron que ambas regiones de la lactoferrina humana lóbulos-N y C se ligan a los receptores bacterianos de la lactoferrina ²⁶⁵. Los receptores de la lactoferrina se han identificado en el tracto gastrointestinal, en los leucocitos y macrófagos, las plaquetas, y en bacterias. Un resumen de estos receptores se presenta en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Receptores de la lactoferrina identificados.

Receptor	Masa molecular (KDa)	Constante de afinidad (Ka)	Especificidad
Intestinal	114 (no reducida) 38 (reducida)	0.3×10^{-6}	+ hololactoferrina + apolactoferrina + lactoferrina desglucosilada + lactoferrina fragmentada - lactoferrina bovina - transferrina
Monocitos	-	$4,5 \times 10^{-9}$	+ lactoferrina - transferrina
Macrófagos	-	$1,7 \times 10^{-6}$	+ lactoferrina
Neutrófilos	-	$2,2 \times 10^{-9}$ $0,6 \times 10^{-9}$	+ lactoferrina
Plaquetas	-	$13,6 \times 10^{-9}$ $1,23 \times 10^{-9}$	+ lactoferrina + transferrina
Bacteriales:	-	-	-
- S.aureus			
- Aeromonas hydrophilia			
- N.meningitides			
- H. Influenzae			
- Shigela flexneri			
Silente:	-	-	-
- Albúmina			
- IgA			
- Lisozima			
- B-lactoglobulina			
- ADN			

1.5.6.- Papel biológico de la lactoferrina:

Todavía existen muchos aspectos por aclarar acerca del papel exacto y mecanismo de acción de la lactoferrina. Se ha demostrado que la lactoferrina juega un papel fundamental en el mecanismo de defensa del huésped así como en el metabolismo

férrico. Su papel en el mecanismo de defensa del huésped va más allá de un mero agente bacteriostático. De hecho a su función bacteriostática se suma que puede ejercer un efecto bactericida y puede frenar la proliferación de otros microbios como los hongos y virus. Es más, tiene un papel importante en el mecanismo de defensa corporal a través de sus acciones immuno-moduladoras. En el metabolismo férrico la lactoferrina parece que interviene en el control de la disponibilidad férrica. Otros mecanismos en los que la lactoferrina está implicada incluyen una función reguladora del crecimiento celular, la coagulación, y quizás la modulación de la adherencia celular, **Figura 4**.

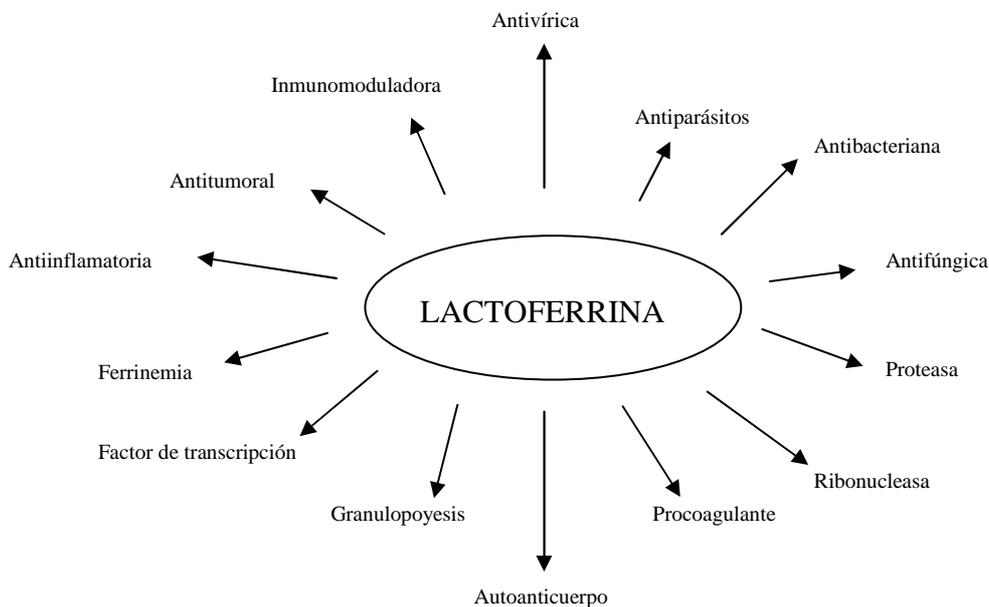


Figura 4: Funciones de la lactoferrina

Muchas de las acciones de la lactoferrina están claramente relacionadas con sus propiedades fijadoras de hierro, pero también es cierto que no todas sus acciones son atribuibles a dicha capacidad fijadora de hierro.

1.5.7.- Defensa del huésped:

El papel de la lactoferrina en la defensa contra los microorganismos se pone en evidencia clínicamente por las infecciones recurrentes vistas en los pacientes con una ausencia de gránulos específicos ²⁶⁶, y por la función granulocítica alterada asociada con una deficiencia de lactoferrina ²⁶⁷. Esto está experimentalmente confirmado por los

resultados de investigaciones en los que se comprobó el efecto proteccionista mostrado por la lactoferrina en la septicemia por *E. coli* experimental ²⁶⁸.

El papel mejor conocido de la lactoferrina en el mecanismo de defensa es su acción bacteriostática por sus propiedades fijadoras de hierro. Durante la fagocitosis, los PMNs degranulan, es decir, las granulaciones desaparecen y su contenido es vertido en el fagosoma de forma secuencial, precediendo las específicas a las primarias ⁶⁰. Inmediatamente después, el pH de la vacuola se hace ácido ²⁶⁹, condición que favorece la actuación de las proteínas granulocitarias. La lactoferrina, que se encuentra con pobre contenido en hierro, podría restringir la disponibilidad de dicho metal dentro del fagosoma, al unirse a él ávidamente, a pH ácido. Dicha restricción favorece la función bactericida del fagosoma, dificultando al mismo tiempo el desarrollo intracelular de la bacteria. Esta hipótesis se ve apoyada por el trabajo de Bullen y Armstrong ²⁷⁰, los cuales consiguieron revertir la actividad bactericida sobre *Pseudomona aeruginosa*, saturando la capacidad transportadora de hierro de la lactoferrina dentro del PMN.

La producción de agentes oxidantes a partir del oxígeno molecular, es un aspecto importante durante la fagocitosis. De ellos, el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), formado a partir del O_2 y del H_2O_2 , destaca por su potencia, actuando no sólo como bactericida dentro del fagosoma, sino también como mediador de daño tisular en la inflamación. La reacción de síntesis, por su lentitud, no tendría eficacia biológica sin la presencia de sustancias que aceleren su velocidad. En este sentido, Ambruso y Johnston ²⁷¹ demuestran como la lactoferrina, unida al hierro es capaz de contribuir al aumento considerable de $\cdot\text{OH}$ en PMNs. Dentro del fagosoma, donde el pH es ácido, el complejo lactoferrina- Fe_2 acelera la producción del potencial oxidante necesario para la actividad antibacteriana ya que la lactoferrina tiene la habilidad de unirse a los iones férricos libres, haciendo que estos no contribuyan a la catálisis de los radicales tóxicos de oxígeno los cuales podrán seguir ejerciendo sus funciones. Podemos concluir que la lactoferrina favorece la actividad de los radicales tóxicos de oxígeno.

Ahora se sabe que la lactoferrina, además de su acción bacteriostática, también puede ser bactericida. El efecto bactericida de la lactoferricina B, un péptido proteolíticamente derivado de la región N-terminal de la lactoferrina, se dice que es varias veces mayor que el de la lactoferrina. La lactoferricina B parece ser letal para un amplio espectro de microbios, inhibiendo la capacidad formadora de colonias de la mayoría de las especies testadas ²⁷². El efecto bactericida de la lactoferrina es llevado a cabo por la permeabilización, es decir dañando la membrana bacteriana exterior con la

alteración subsiguiente de su permeabilidad. La membrana bacteriana dañada incorpora la lactoferrina teniendo lugar a continuación una dispersión de lipopolisacáridos (LPS)²⁷³. El componente activo lactoferrina/lactoferricina B en la membrana bacteriana se dice que es una molécula proteica de 38-kDa, conocida como porina²⁷⁴.

Parece ser que la lactoferrina también tiene efectos fungicidas y quizás antivirales. El efecto antifungicida no está del todo aclarado, pero se conoce que fracciones monoproteicas de *Cándida albicans* aumentan el número de células polimorfonucleares fungifagocíticas²⁷⁵. También se ha demostrado la matanza directa y supresión de la capacidad formadora de colonia de *Cándida albicans* por los fragmentos N-terminales de la lactoferrina, al parecer a través del mismo mecanismo que ejerce su efecto bactericida²⁷⁶. El efecto de la lactoferrina en la proliferación viral todavía es polémico. Los neutrófilos mostraron tener reducido el contenido de lactoferrina tras las infecciones virales. Este déficit de lactoferrina de los neutrófilos se sugiere que juega un papel importante en las sobreinfecciones bacterianas postvirales²⁷⁷.

1.5.8.- Regulación de la respuesta inmune por la lactoferrina:

La lactoferrina, como previamente se mencionó, parece jugar un papel extenso en el mecanismo de defensa modulando ciertas pautas inmunológicas²¹⁸. Existen observaciones que hacen pensar en un papel inmuno-modulador que incluye la inhibición de la producción de varias citoquinas incluidas TNF- α y la IL-1 β , que juegan un importante papel en la respuesta inflamatoria. Se piensa que la inhibición en la liberación del TNF- α por la lactoferrina es debida a su capacidad de actuar como anti-endotoxina por fijación al lípido A de los LPS liberados de las bacterias lisadas, de modo que inhibe la fijación de los LPS a los receptores CD14 de los monocitos/macrófagos donde se inicia la respuesta proinflamatoria. Sin embargo, la identificación de receptores para la lactoferrina en la superficie de mieloblastos, monocitos, macrófagos y linfocitos además de las células epiteliales involucradas en la producción local de TNF- α , sugiere que la lactoferrina puede tener un efecto directo en la regulación de la producción de citoquinas por estas células a través de su unión a los receptores específicas de los mismos²⁷⁸.

Además la lactoferrina puede estar involucrada también en la inmunotolerancia, evitando la activación del sistema del complemento²⁷⁹. Sin embargo existe estudios que informan que puede activar la vía clásica del complemento²⁸⁰.

Un resumen de sus funciones inmunomoduladoras están recogidas en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Funciones moduladoras de la lactoferrina en los mecanismos de defensa del huésped

Funciones Moduladoras	Mecanismos Probables
1. La lactoferrina aumenta la acumulación de neutrófilos y su adherencia a los tejidos en el lugar de la injuria.	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción de la carga de superficie y por tanto de las fuerzas repulsivas.
2. La lactoferrina aumenta la adhesividad de los granulocitos favoreciendo las interacciones celulares.	<ul style="list-style-type: none"> • La lactoferrina se une a la superficie de las células polimorfonucleares y reduce su carga superficial.
3. El papel de la lactoferrina en la producción de radicales libres:	
a) En medio ácido como el del fagolisosoma, la lactoferrina puede promover la producción de radicales para la destrucción intragranulocítica de microorganismos catalizando la producción neutrofílica de radicales hidroxilos.	a) Suministra hierro al sistema generador de radicales de oxígeno.
b) En el caso de valores normales de pH extracelular, la lactoferrina puede inhibir la producción de radicales libres y de este modo disminuir el daño oxidativo de los tejidos:	b) Secuestrando hierro.
<ul style="list-style-type: none"> • La lactoferrina inhibe la producción de radicales libres por monocitos estimulados. • La lactoferrina puede proteger a los neutrófilos del daño peroxidativo lipídico. • La lactoferrina inhibe el mecanismo de peroxidación lipídica. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mecanismo dependiente de la unión al hierro. • Mecanismo dependiente de la unión al hierro. • Mecanismo dependiente de la unión al hierro ya que la lactoferrina saturada de hierro está demostrado que no tiene efecto inhibitor.
4. Debido a su función reguladora del crecimiento:	
a) Los efectos parecen ser fundamentalmente de naturaleza inhibidora:	
<ul style="list-style-type: none"> • Inhibe la proliferación de linfocitos inducidos por mitógenos y aloantígenos. • Bloquea la liberación de histamina por los mastocitos de rata. • Inhibe la síntesis de anticuerpos. • Favorece el control de la actividad de monocitos/macrófagos. • Acción anticomplemento. • Aumenta la citotoxicidad de las células natural killer (NK) y la citotoxicidad de las linfocinas de las células killer activadas (LAK). 	<ul style="list-style-type: none"> • Desconocido, podría ser dependiente de sus propiedades quelantes de hierro. • Desconocido, pero aparentemente dependiente de la saturación de hierro. • Desconocido. • Desconocido • Controvertido. Algunos encuentran una acción procomplemento. • Desconocido pero independiente de la saturación férrica o de la actividad RNasa.
b) Mecanismo de acción de la lactoferrina a través de su acción sobre la actividad de las citoquinas	
<ul style="list-style-type: none"> • La lactoferrina suprime la secreción del factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos. • El 50% de la lactoferrina saturada por hierro inhibe la liberación de citoquinas tales como TNF, IL-1β e IL-2 a modo dosis-dependiente y tiempo-dependiente. • La lactoferrina solo afecta la liberación pero no la actividad biológica de las citoquinas. • La lactoferrina en presencia de lipopolisacáridos, aumenta la producción de de IL-1β, TNF-α, IL-6 y prostaglandinas. 	<ul style="list-style-type: none"> • La inhibición de la síntesis de IL-1 dependiente de la concentración de lactoferrina (feedback negativo). • Desconocido. • Desconocido. • No conocido pero independiente de la saturación férrica.
5. La lactoferrina puede modificar la respuesta inflamatoria en el SLE por unión al ADN.	<ul style="list-style-type: none"> • La interacción entre la lactoferrina y el ADN impide la unión del ADN con los anticuerpos anti-ADN. También es capaz de disgregar la unión ADN y anticuerpos anti-ADN.
6. La lactoferrina de neutrófilos aumenta la capacidad antimicrobial de macrófagos.	<ul style="list-style-type: none"> • Los macrófagos ingieren granulocitos (ricos en lactoferrina) como fuente de lactoferrina y mieloperoxidasa.
7. La lactoferrina incrementa la función de los polimorfonucleares por aumento de sus motilidad y favoreciendo la producción de superóxidos.	<ul style="list-style-type: none"> • Desconocido, pero aparentemente independiente de la saturación férrica pudiendo ser abolido por anticuerpos antilactoferrina.
8. La lactoferrina puede sustituir a los anticuerpos en la activación de la vía clásica del complemento.	<ul style="list-style-type: none"> • Desconocido, aunque parece ser que interviene la adherencia de la lactoferrina a la membrana.

1.5.9.-Papel en el metabolismo férrico:

La lactoferrina de la leche materna se absorbe intacta por el intestino de los lactantes ²⁶². La observación de una concentración de lactoferrina y una disponibilidad férrica mayor en la leche materna que en la bovina originó la hipótesis de que la lactoferrina podría favorecer la absorción férrica en los lactantes alimentados con pecho. Esto parece ser probado por el hallazgo de una mejor absorción férrica por los lactantes alimentados con leche materna que en los recién nacidos alimentados con leche bovina ²⁸¹. Que la lactoferrina aumente la absorción férrica es, sin embargo, todavía controvertido ²⁴⁰ pero varios hallazgos parecen apoyar tal posibilidad, entre otros:

- La habilidad del enterocito humano de extraer hierro de la lactoferrina ²⁸².
- La alta captación de lactoferrina por los enterocitos ²⁸².
- La correlación entre la excreción urinaria férrica neonatal con la concentración láctea de lactoferrina, así como con la captación de leche del pecho ²⁸³.
- El transporte férrico a través del cepillo intestinal por la lactoferrina ²⁸⁴.

La lactoferrina puede afectar los mecanismos fisiológicos celulares quizás a través de su influencia en la disponibilidad férrica. El hierro se conoce que afecta a las funciones celulares del huésped actuando sobre el ADN, y en menor grado sobre el ARN y síntesis de proteínas, la expresión de marcadores de superficie de linfocitos, la secreción de inmunoglobulinas, la expresión del receptor de interleukina-2 y muchas otras ²⁸⁵. La lactoferrina puede así, a través de su efecto en la disponibilidad férrica, indirectamente influir en un espectro ancho de actividades fisiológicas.

Una de las características de los procesos infecciosos e inflamatorios, es el rápido descenso de la concentración sérica de hierro ²⁸⁶. Hoy día se sabe que este fenómeno es parte integrante de un conjunto más amplio de acontecimientos que se ponen en marcha en respuesta a la liberación del pirógeno endógeno, o también denominado IL-1,

Figura 5.

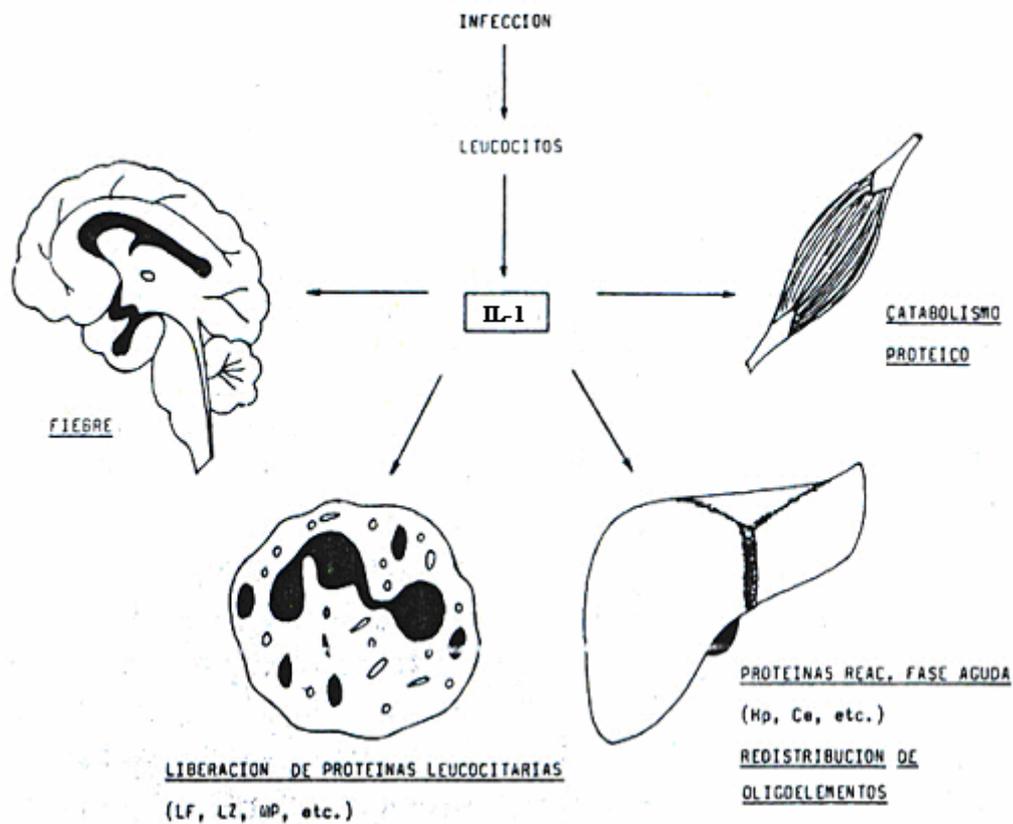


Figura 5: Efectos de la IL-1 sobre la concentración sérica de hierro.

Dicho péptido es el responsable de la fiebre, el catabolismo proteico, la síntesis hepática de proteínas reactantes de fase aguda y la alteración en los niveles plasmáticos de ciertos oligoelementos como el hierro, zinc y cobre²⁸⁷. Sobre los propios PMNs, la IL-1 es capaz de estimular la liberación del contenido de sus granulaciones específicas hacia el medio extracelular, tanto en ausencia de fagocitosis como de adherencia a otras células²⁸⁸. Este hecho enlaza con la teoría de Van Snick et al²⁵⁵, según la cual la lactoferrina liberada por los PMNs es responsable de la hiposideremia en la inflamación. El complejo lactoferrina-Fe₂ es captado por los macrófagos, resultando un bloqueo de dicho oligoelemento a nivel del sistema fagocítico-mononuclear. De esta forma, hay menos cantidad de hierro almacenado como ferritina disponible para la síntesis de hemoglobina. Hansen et al²⁸⁹ encontraron un marcado descenso en la concentración de lactoferrina intragranulocitaria en las primeras fases de una infección aguda, coincidiendo con un máximo ascenso de la concentración de lactoferrina plasmática. Esta observación refuerza todavía más la citada teoría.

El atrapamiento del hierro a nivel del sistema fagocítico-mononuclear, perpetuado en el tiempo por la continuidad de un proceso inflamatorio (tuberculosis, supuración, colagenosis, etc.), es un factor decisivo en el desarrollo de lo que conocemos como anemia de los trastornos crónicos, cuyo patrón, hiposideremia, aclaramiento plasmático de hierro acelerado y aumento de los depósitos reticuloendoteliales, puede ser explicado por las alteraciones fisiopatológicas anteriormente mencionadas.

1.5.10.-Lactoferrina y la mielopoyesis:

El efecto exacto de la lactoferrina en la mielopoyesis todavía está debatiéndose. Está implicada en la regulación de la granulopoyesis por la inhibición de la mielopoyesis a través de un mecanismo de feedback negativo ²⁹⁰⁻²⁹³.

El papel de la lactoferrina como regulador de la mielopoyesis podría ser contemplado del siguiente modo: en respuesta a una infección bacteriana, se produce una leucocitosis neutrofilica, fruto de la liberación de CSA por las células mononucleares (familia de glucoproteínas denominadas colectivamente “Actividad Estimuladora de Colonia” o CSA capaces de aumentar la formación de colonias “*in vitro*” ²⁹⁴ y sintetizadas fundamentalmente por los monocitos macrófagos y los linfocitos T). La liberación concomitante de interleukina 1 por los monocitos, principal fuente de dicho mediador, condiciona, junto a otros efectos, una activación y degranulación de los PMNs aun en ausencia de fagocitosis, encaminadas a yugular el proceso infeccioso. La apo-lactoferrina liberada al medio extracelular, capta hierro de la transferrina, y de esta forma se une a receptores específicos de los macrófagos, resultando no sólo un bloqueo de dicho oligoelemento en el sistema fagocítico-mononuclear, sino también una modulación de la producción de CSA para adaptar la mielopoyesis a las necesidades de cada momento, **Figura 6**.

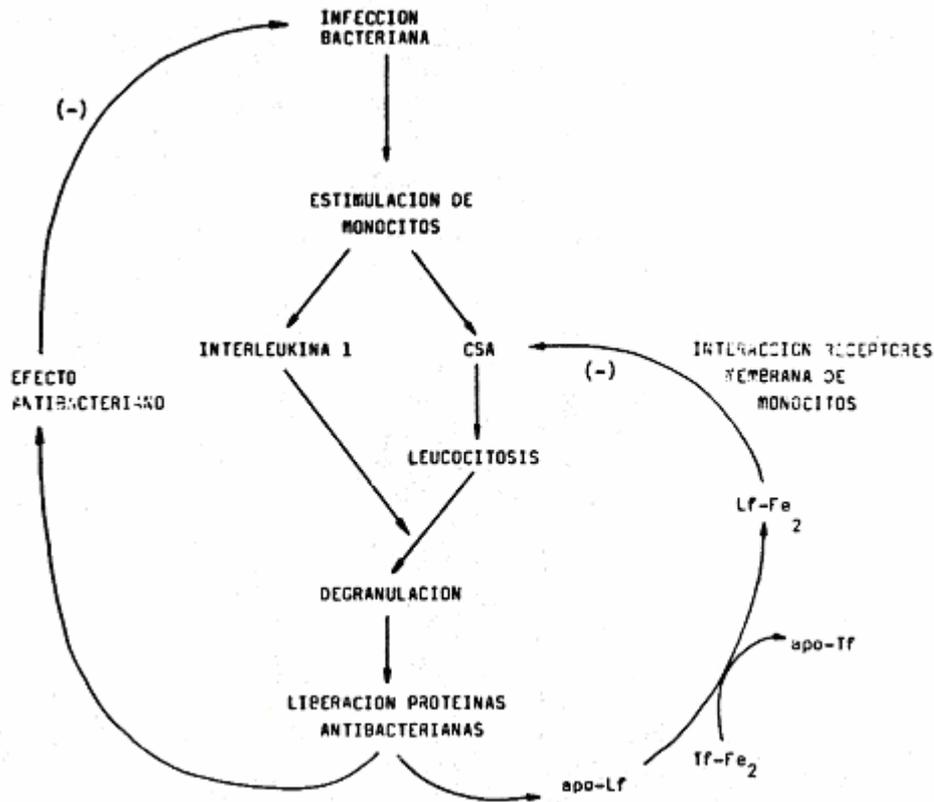


Figura 6: Inhibición de la mielopoyesis por la lactoferrina.

Pero además se ha observado como la lactoferrina se fija a receptores específicos en las células hematopoyéticas, se internaliza en tales células, y se une con el ADN dentro del núcleo. La eucromatina se ha sugerido como el sitio funcional probable para la acción inhibitoria de la lactoferrina.

Por último es posible que la lactoferrina juegue un importante papel patogénico en neutropenias de origen central ²⁹⁵, en las que presumiblemente existe una alteración de los mecanismos que regulan la mielopoyesis.

1.5.11.-Otras funciones de la lactoferrina:

Otras funciones de la lactoferrina son menos conocidas pero no por ello menos importantes, algunas de la cuales son:

- Las proteínas de fase agudas se definen como las proteínas cuya concentración en el plasma aumenta un 25% o más en infecciones o inflamación. Varios autores han sugerido que la lactoferrina se clasifique como una proteína de fase aguda.

- La presencia de anticuerpos anti-lactoferrina en ciertas enfermedades autoinmunes hace suponer su participación en la inmunotolerancia **Tabla 3**.

Tabla 3: Enfermedades con anticuerpos anti-lactoferrina y la frecuencia y el porcentaje con el que aparecen.

<i>Enfermedad</i>	<i>Frecuencia y porcentaje de anticuerpos anti-lactoferrina</i>
Enfermedad de Crohn	ocasionalmente, 34%, 8%
Colitis ulcerosa	alta, 45-50%
Colangitis esclerosante	alta, 50%
AR no complicada	ocasionalmente, 2,4%, 4%, 10%, 20%
Lupus eritematoso sistémico	ocasionalmente, 20%, 15-20%, 39%
Síndrome de Sjögren primario	ocasionalmente
Esclerodermia	19%
Síndrome de Felty	50%

- Una función antitrombótica también se ha atribuido a la lactoferrina. La posibilidad de que la lactoferrina o sustancias derivadas de la lactoferrina puedan influenciar la función de las plaquetas se apoya en observaciones como:
 - 1) la presencia de receptores de lactoferrina en las membranas de las plaquetas ²⁹⁶.
 - 2) la inhibición de la agregación plaquetaria ADP-tratada ²⁹⁷.
 - 3) la inhibición del fibrinógeno que liga las plaquetas ADP-tratadas.
 - 4) la inhibición de la agregación de las plaquetas, generación del tromboxanos y descarga de serotonina ²⁹⁸.
- La lactoferrina es capaz de promover la adherencia de los leucocitos a las paredes endoteliales, por lo que amplifica la respuesta celular inflamatoria ²⁹⁹.
- La lactoferrina neutrofílica, en cantidades similares a las halladas en el líquido de las vías aéreas ³⁰⁰, induce en los eosinófilos varios efectos: la producción de superóxido, la degranulación de los mismos con liberación de EDN y la síntesis de leucotrienos con la subsiguiente secreción de LTC₄ ³⁰¹.
- La lactoferrina tiene propiedades de RNAasa y DNAasa, por lo que puede ejercer acciones de citotoxicidad ³⁰².
- La lactoferrina influye en la actividad de las células natural killers (NK cells) y sobre algunas otras células exhibiendo efectos citotóxicos.

- La lactoferrina es capaz de inducir la secreción de TNF- α , IL-8, óxido nítrico, y GM-CSF a partir de macrófagos humanos³⁰³.
- La lactoferrina es capaz de inhibir la secreción de histamina y la actividad de la triptasa, quimasa y catepsina G³⁰⁴⁻³⁰⁸.

Algunas de estas funciones sugieren que la adhesión de la lactoferrina al epitelio puede constituir un mecanismo iniciador del proceso inflamatorio dentro de las vías aéreas. Es también posible que otros factores diferentes a la IgE (e.j lactoferrina liberada por los neutrófilos) actúen también como inductores de la activación/liberación de los eosinófilos en los procesos atópicos IgE-mediados. Los hallazgos de que ECP secretada por los neutrófilos estimula la liberación de la lactoferrina por las glándulas serosas de la mucosa del árbol respiratorio, aumenta la posibilidad de que la activación del eosinófilo por esta lactoferrina pueda también tener lugar a través de un mecanismo feedback positivo generado por la propia ECP del eosinófilo con la consiguiente activación persistente de esta célula dentro de la vía aérea. Por lo tanto es posible que la activación del neutrófilo mediada por la IgE pueda modular la respuesta de los eosinófilos en los procesos atópicos³⁰⁹, **Figura 7**.

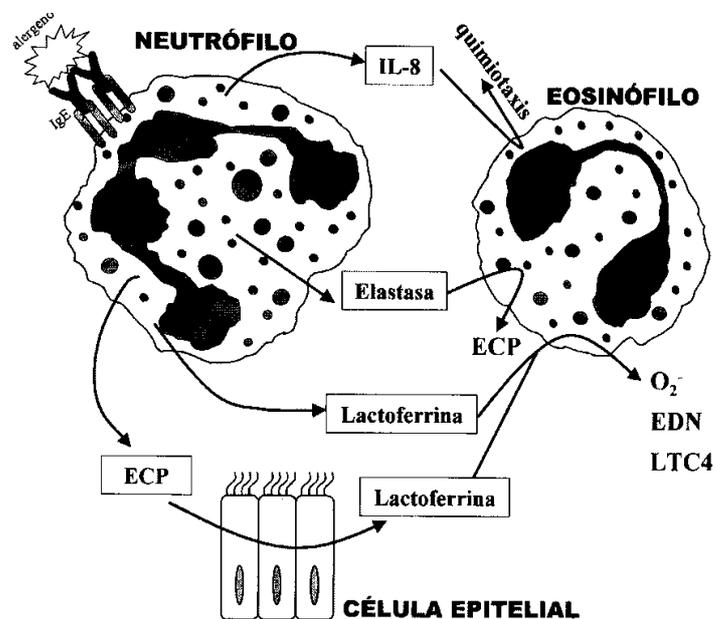


Figura 7: La lactoferrina como inductora de la activación/liberación de los eosinófilos en los procesos IgE-mediados.

A pesar de estos conocimientos no se conocía por el momento si la liberación de lactoferrina por el neutrófilo de los pacientes alérgicos pudiera deberse directamente a un mecanismo alérgeno-dependiente.

1.5.12.- Posibles aplicaciones clínicas:

El estudio de la lactoferrina puede tener utilidad clínica tanto desde el punto de vista diagnóstico como pronóstico y orientarnos sobre la cinética del neutrófilo en el curso de procesos tales como leucemia granulocítica, la pancreatitis calcificada crónica, la fibrosis quística, la septicemia, la aplasia congénita de los vasos deferentes y vesículas seminales, la esquizofrenia, inflamación de la articulación y degradación del cartílago, psoriasis y artritis reumatoide. Se han demostrado anticuerpos de lactoferrina en los pacientes con el síndrome de Felty, y el descubrimiento de estos anticuerpos puede ser útil en su diagnóstico. Se ha sugerido más allá que la β -lactoferrina/RNAasa y γ -lactoferrina/RNAasa pueden ser de valor en el descubrimiento de cáncer de mama.

El estudio de la lactoferrina liberada por los neutrófilos nos puede ayudar a aclarar el papel de los mismos en el proceso inflamatorio alérgico, pudiendo en un futuro resultar útil como herramienta diagnóstica e incluso pronóstica, y no debemos olvidar la posible utilidad terapéutica gracias a su papel modulador del proceso inflamatorio.

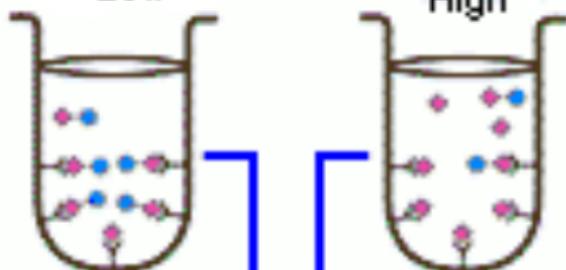
1. Competitive Reaction



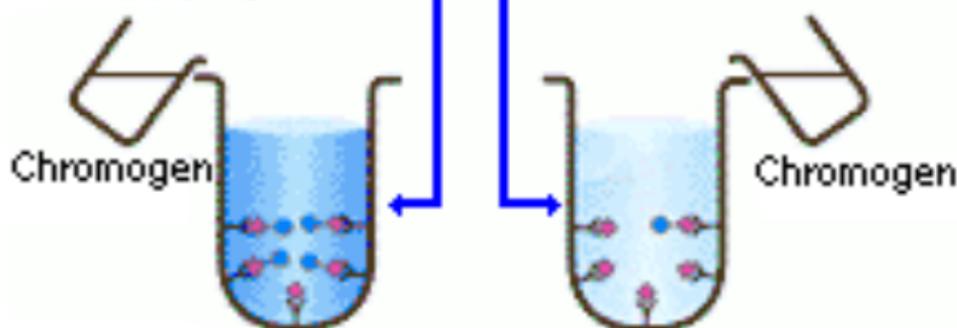
Analyte Concentration

Low

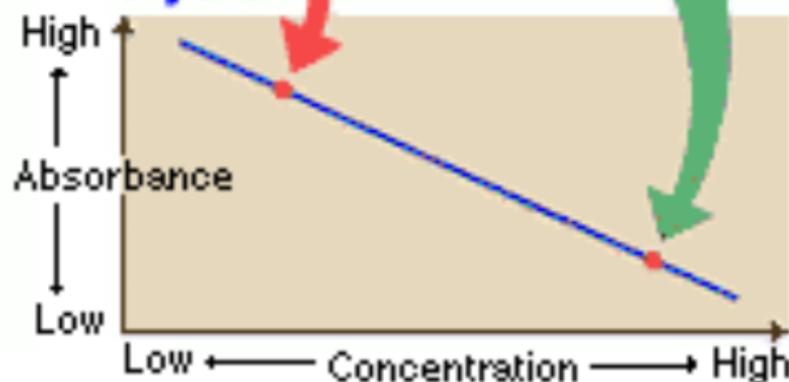
High



2. Chromogenic Reaction



3. Quantitative Analysis



Coated antibody

Add the sample

Incubation by shaking 30 min

Troponin-complex in sample

Washing

Add labelled antibody

Incubation by shaking 30 min

Antibody labelled by HRP

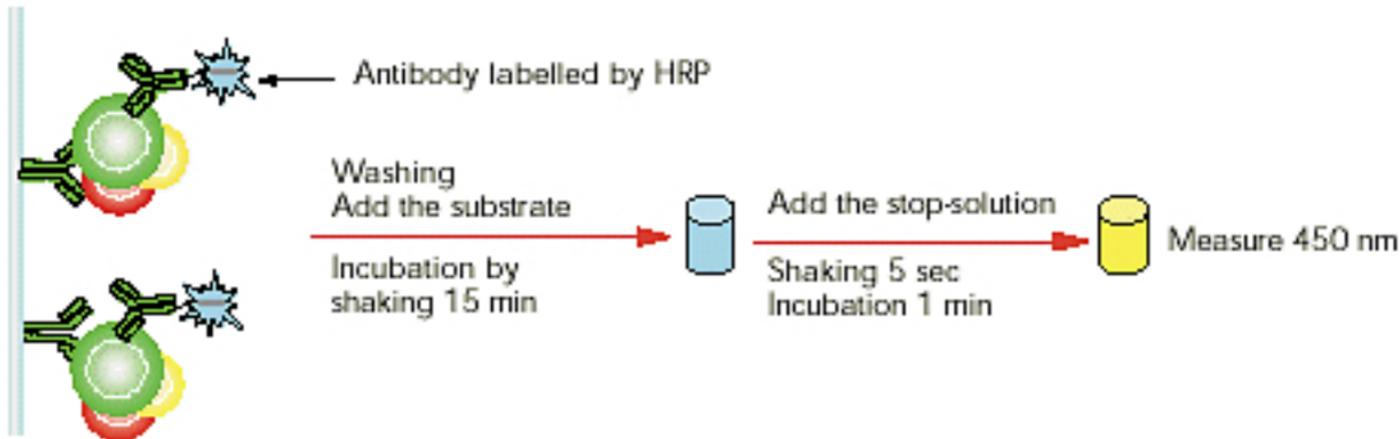
Washing
Add the substrate

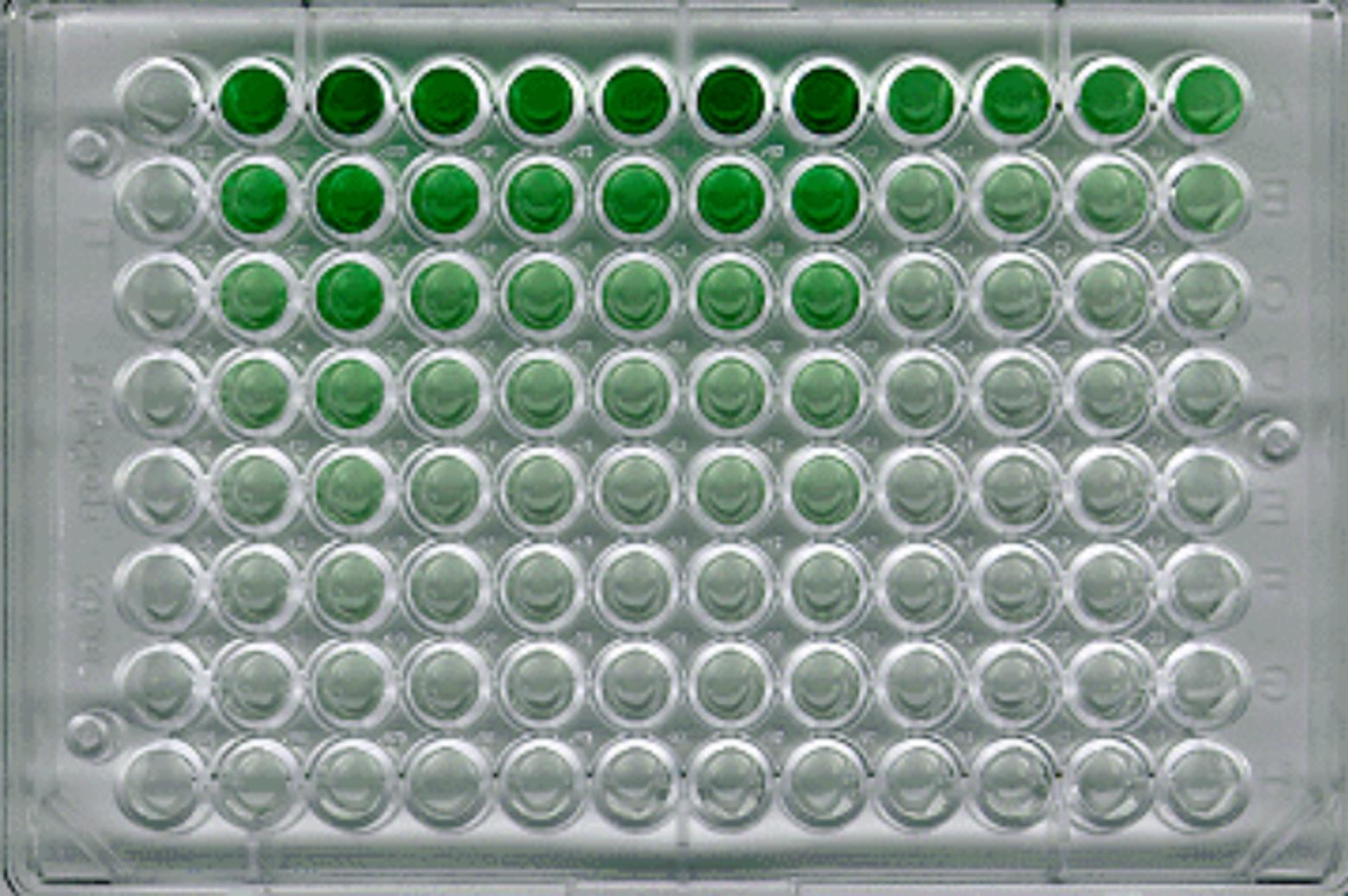
Incubation by shaking 15 min

Add the stop-solution

Shaking 5 sec
Incubation 1 min

Measure 450 nm





HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Este trabajo, sigue la línea de investigación que este Servicio realiza sobre la participación directa del neutrófilo en la respuesta alérgica, estudiando las posibles modificaciones sobre aspectos funcionales de los neutrófilos de enfermos alérgicos y su comportamiento tras estímulos específicos.

Esta demostrada la presencia de moléculas de IgE en la superficie de neutrófilos, no sólo de pacientes alérgicos, sino también de sujetos sanos. Esto significa que si estas células poseen receptores de IgE y moléculas de IgE en su superficie, cabe la posibilidad de que puedan estimularse por un mecanismo dependiente de esta inmunoglobulina, elemento clave de las reacciones alérgicas. Efectivamente, nuestro grupo demostró como esta célula podía activarse por este mecanismo e incluso se pudo comprobar, por citometría de flujo y por microscopía de fluorescencia, como los alérgenos se unían a la superficie de los neutrófilos de una forma específica.

La exocitosis juega un papel muy importante en la fisiología del neutrófilo. La secreción de los distintos gránulos parece regular las respuestas tempranas de estas células, como la adhesión y extravasación de las mismas. Los neutrófilos poseen varios gránulos: los azurófilos o gránulos primarios, definidos por su contenido en mieloperoxidasa y elastasa; los secundarios o específicos, ricos en lactoferrina; los terciarios, ricos en gelatinasa y otros orgánulos denominados vesículas secretorias con predominio de fosfatasa alcalina. Los gránulos azurófilos contienen un gran número de enzimas líticos que pueden lesionar el tejido subyacente si se liberan por un mecanismo fuera de control. Los específicos y terciarios constituyen un reservorio de proteínas de la membrana plasmática celular, que se traslocan a la superficie de la misma después de la activación celular. Al mismo tiempo, contienen una amplia gama de proteínas implicados en la adhesión y extravasación de los neutrófilos humanos, así como enzimas involucrados en la generación de mediadores solubles de la inflamación. La lactoferrina es una proteína transportadora de hierro, que se encuentra presente en las granulaciones específicas o secundarias de los neutrófilos y que se revela cada vez más como una pieza fundamental en los acontecimientos fisiopatológicos ligados a la infección e inflamación: participa en los mecanismos antibacterianos de los polimorfonucleares, se comporta como un importante regulador de la mielopoyesis, y además juega un papel fundamental en la modulación del proceso inflamatorio de las vías aéreas.

Los diferentes gránulos poseen funciones fisiológicas distintas, por lo que la exocitosis de los mismos se regula por mecanismos independientes, tanto que la degranulación de los azurófilos puede realizarse sin que se efectúe la de los secundarios y viceversa. Pues bien, nuestro grupo ha demostrado como los gránulos azurófilos se liberan mediante un mecanismo IgE-dependiente ^{84,867}. Como los gránulos secundarios juegan también un papel trascendental en la respuesta del neutrófilo y a la luz de la presencia de lactoferrina en procesos alérgicos, hemos querido comprobar si efectivamente se podía realizar también una exocitosis de los gránulos secundarios o específicos por un mecanismo antígeno-específico e IgE-mediado.

Para la realización del presente estudio nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1°** Estudiar si existe un mecanismo antígeno-específico para la liberación de una de las proteínas de los gránulos específicos del neutrófilo, como es la lactoferrina, en los pacientes alérgicos.
- 2°** Comprobar si existe una modulación dosis-dependiente y tiempo-dependiente en la liberación de la lactoferrina tras la exposición antígeno-específica, una vez demostrado el anterior apartado.
- 3°** Demostrar la especificidad de la liberación de la lactoferrina por los antígenos a los que los pacientes atópicos son sensibles.
- 4°** Estudiar si la IgE específica de la superficie celular del neutrófilo es responsable de la liberación de la lactoferrina a través de un mecanismo IgE-dependiente y descartar la participación de la IgG.
- 5°** Si demostramos que la reacción es IgE-dependiente, comprobar si la cantidad de IgE específica sérica se corresponde con la cantidad de lactoferrina liberada por los neutrófilos tras el estímulo alérgico.

6°

Comprobar que los resultados de este estudio desarrollado en los pacientes alérgicos son consecuencia de su carácter atópico e independientes del cuadro clínico (rinitis/asma).

7°

Evaluar la correlación entre la liberación de lactoferrina y la función pulmonar de los pacientes, medida con el FEV₁, y sus variaciones en función de las respuestas obtenidas en los test de provocación bronquial.

8°

Determinar si la liberación de lactoferrina por los neutrófilos de pacientes alérgicos se relaciona de alguna forma con la gravedad del asma, según los cuadros establecidos en consensos internacionales como el GINA.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- PACIENTES Y CONTROLES

El grupo seleccionado para nuestro trabajo está constituido por pacientes adultos atópicos con clínica de rinitis y/o asma bronquial alérgica que acuden a las consultas externas del Servicio Regional de Inmunología y Alergia, en el Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla, y por un grupo control de voluntarios sanos no atópicos. Se excluyeron los individuos fumadores.

Para realizar esta selección, consideramos que los pacientes tienen asma bronquial cuando refieren una historia de episodios recurrentes de disnea y sibilancias en los que, de forma espontánea o tras tratamiento con fármacos broncodilatadores, tiene lugar una mejoría parcial o total de los síntomas.

Por su parte, encuadramos como pacientes con rinitis a aquellos que presentan los síntomas y signos clásicos de este proceso (estornudos en salvas, obstrucción nasal, prurito nasal, rinorrea, etc.).

A cada uno de estos enfermos atópicos se les realizó una exhaustiva historia clínica:

- a) Filiación:
 - Nombre, edad, sexo.
- b) Anamnesis detallada:
 - Cuadro clínico, síntomas y signos de la enfermedad.
 - Años de evolución del proceso.
 - Intensidad subjetiva de la clínica.
- c) Exploración física general.
- d) Tests cutáneos mediante la técnica de prick test. Los alérgenos utilizados son extractos antigénicos disponibles comercialmente, incluidos *D. pteronyssinus*, *Olea europaea* y *Artemisia vulgaris*, de los Laboratorios Bial-Aristegui (Bilbao, España).
- e) Determinación sérica de IgE total e IgE específica por HYTEC 288 (Hycor Biomedical Inc.-IZASA, Barcelona, España).

Una vez realizadas estas pruebas, se aceptaron aquellos pacientes atópicos que tenían test cutáneos e IgE específica positiva a uno o varios de los alérgenos estudiados.

Además, estos pacientes cumplían otros requisitos como:

- Ningún sujeto tenía historia de infección del tracto respiratorio superior en las 6 semanas anteriores.

- Al comenzar con los tests “in vivo” los pacientes no debían estar utilizando ketotifeno, astemizol ni corticoides al menos 4 semanas antes; antihistamínicos, cromoglicato disódico y nedocromil sódico 7 días antes; betaagonistas por vía oral y metilxantinas 3 días antes y betaagonistas por vía inhalatoria 24 horas antes.
- A ninguno de estos pacientes se les administró inmunoterapia específica con anterioridad.
- En todos, se descartó otro proceso patológico concomitante que pudiera interferir los resultados.
- Los pacientes debían estar sin síntomas en las 4 semanas previas.

Los controles sanos formados por voluntarios, no tienen ninguna historia de alergia o síntomas bronquiales, sus tests cutáneos e IgE específica con una batería de neumoaerógenos (ácaros del polvo doméstico, pólenes, hongos, y epitelios de animales) son negativos y no padecen otra patología asociada.

Para demostrar la especificidad de cada etapa realizamos el mismo abordaje experimental en dos tipos de controles: voluntarios sanos y pacientes alérgicos no sensibles al alérgeno a estudiar.

Los pacientes alérgicos diagnosticados con asma a su vez fueron clasificados según el grado de severidad de su enfermedad siguiendo el cuadro establecido en consensos internacionales como el GINA.

Clasificación de la gravedad del asma según la GINA

	SÍNTOMAS DIURNOS	SÍNTOMAS NOCTURNOS	PEF ó FEV₁ Variabilidad PEF
Leve Intermitente	< 1 vez a la semana Asintomático y PEF normal entre ataques	≤ 2 veces al mes	$\frac{\geq 80\%}{< 20\%}$
Persistente Leve	> 1 vez a la semana < 1 vez al día Los ataques pueden afectar la actividad	> 2 veces al mes < 1 vez a la semana	$\frac{\geq 80\%}{20 - 30\%}$
Persistente moderado	Diarios Los ataques afectan la actividad	> 1 vez a la semana	$\frac{60 - 80\%}{> 30\%}$
Persistente grave	Continuados Actividad física limitada	Frecuentes	$\frac{\leq 60\%}{> 30\%}$

3.2.- TEST CUTÁNEOS

Para su realización se siguió la técnica del prick, que describiremos a continuación, utilizada para el diagnóstico etiológico de procesos atópicos.

a) Material:

- Algodón hidrófilo.
- Alcohol etílico de 96°.
- Papel de celulosa absorbente.
- Lancetas (Dome-Hollister-Stier, Bayer, Madrid, España).
- Extractos alérgicos para diagnóstico mediante prick, en solución salina fisiológica con glicerina al 50% y fenol al 0,5%, elaborado por los Laboratorios Bial-Aristegui (Bilbao, España) y comercializados a una

concentración de 5 UBE (Unidades Biológicas Equivalentes). La batería elegida para este estudio consta de los siguientes extractos alergénicos: D. pteronyssinus, Olea europaea, y Artemisia vulgaris.

b) Procedimiento:

En primer lugar desinfectamos la piel de la cara ventral de ambos antebrazos con alcohol etílico utilizando una torunda de algodón hidrófilo, dejándola secar a continuación.

En la superficie cutánea a utilizar marcamos tantos puntos como alérgenos vamos a probar y dos más para los controles positivos y negativos, guardando como mínimo 3 cms de distancia entre ellos.

Al lado de cada marca depositamos una gota del extracto correspondiente y practicamos una punción a través de cada gota con una lanceta diferente para cada extracto, manteniendo una inclinación aproximada de 45° respecto al plano de la piel. En este punto se tuvo la precaución de no producir sangrado con la punta ni tampoco arañar la piel, para evitar posibles alteraciones en los resultados.

Posteriormente dejamos un periodo de 15 minutos para la actuación del extracto, una vez transcurrido el cual secamos la superficie de los antebrazos con papel de celulosa absorbente. A continuación, mediante la utilización de una regleta transparente milimetrada, leímos los resultados tomando como referencia los controles positivos (histamina) y negativo (cloruro sódico) para valorar el grado de reactividad cutánea de cada sujeto.

Consideramos resultados positivos aquellas pápulas cuyo diámetro fuese, cuando menos, 3 mms superior al del control negativo, siempre que el control positivo mostrará una reactividad adecuada.

3.3.- PREPARACIÓN DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES, CONTAJE, ESTUDIO DE SU VIABILIDAD

a) Material:

- Pipetas graduadas (Finnipipette).
- Dextrano T-500 al 0,7% (farmacia Biotech, Upsala, Suecia).
- Ficoll-Hypaque (d = 1,077) (Bio-Wittaker, USA, América).
- CINA al 1,8% (Sigma, USA, América).

- Tobos de ensayo heparinizados.
- H₂O destilada desionizada
- Solución salina tamponada con fosfatos (PBS) (Bio-Wittaker).
- Suero fisiológico (Braun).
- Centrífuga con termostato (Jouan).
- Pipetas Pasteur.
- Solución azul tripan al 0,4%, disuelto en ClNa al 0,9% (Serva).
- Cámara de Neubauer (Assistent).
- Microscopio óptico (Nikon).
- Anticuerpos anti-CD9 de ratón (Immunotech-IZASA, Barcelona, España).
- Anticuerpo IgG de cabra anti-ratón con bolas micromagnéticas (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Alemania).
- Columna imantada de acero (Dynal MPC-6®, Dynal AS. N-0212, Oslo, Noruega).

b) Procedimiento:

Los neutrófilos humanos son purificados tras la extracción de 20 c.c. de sangre venosa periférica, la cual es recogida en un tubo de ensayo heparinado.

A esta sangre heparinizada le agregamos Dextrano T-500 y lo mezclamos cuidadosamente durante 2 minutos mediante agitación de 90° y se deja sedimentar unos 45-60 minutos.

Transcurrido este tiempo, extraemos con cuidado el sobrenadante de color amarillento con una pipeta Pasteur y se vierte cuidadosamente sobre un tubo de ensayo que contiene Ficoll-Hypaque, en proporción 1:2 de Ficoll:sangre, haciendo resbalar el sobrenadante sobre la pared del tubo para evitar que se mezclen y pueda quedar sobre el Ficoll. A continuación centrifugamos a 2000 rpm durante 20 minutos a 4°C.

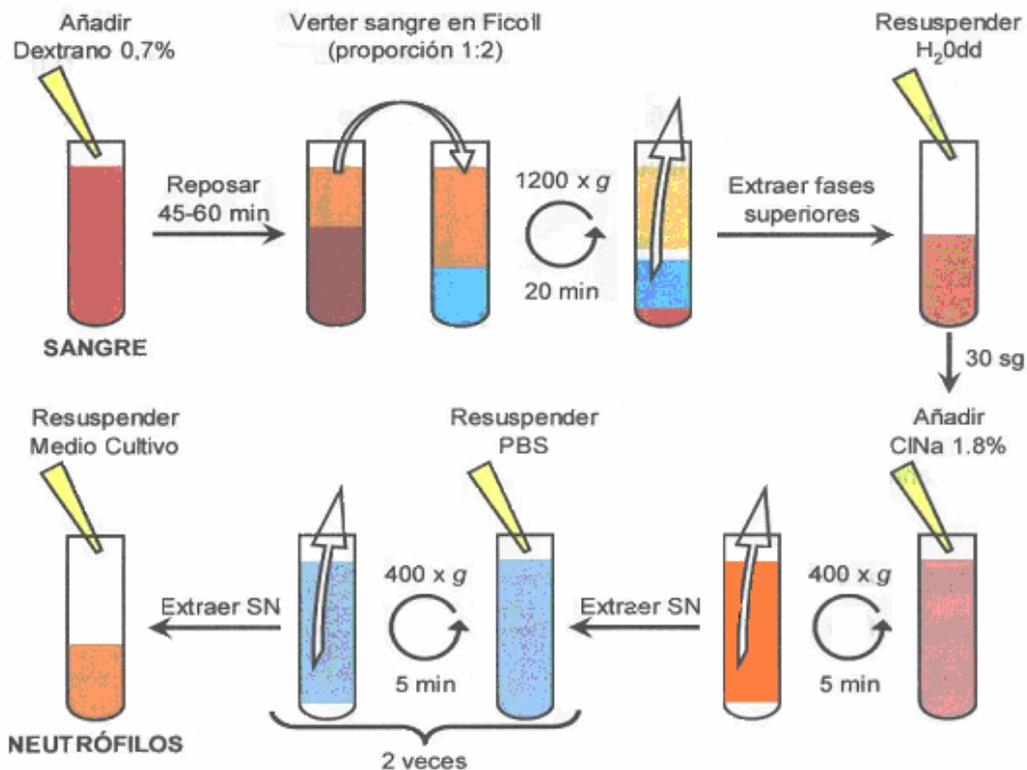


Figura 8: Esquema de aislamiento de neutrófilos humanos.

Después de esta centrifugación, nos encontramos con diferentes fracciones (de arriba a bajo): plasma, anillo linfocitario (donde se encuentran los linfocitos y monocitos), Ficoll, y abajo un precipitado rojizo donde se encuentran los neutrófilos y hematíes. Primero se extrae el anillo de linfocitos y monocitos y después el resto de sobrenadante, quedando sólo el botón de neutrófilos y hematíes.

Al pellet rojizo, le realizamos un choque hemolítico hipotónico para romper los hematíes: resuspendemos el precipitado añadiendo 5 ml de agua destilada y desionizada (H₂O dd), y a continuación añadimos rápidamente (en menos de 30 segundos) 5 ml de CINa al 1,8% que devuelve la solución a una concentración isotónica. La suspensión celular se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Los precipitados resultantes se someten a dos procesos de lavado por resuspensión en 10 ml de PBS y centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos a 4°C.

Finalmente, descartando el sobrenadante, el pellet celular conseguido, que corresponde a neutrófilos humanos, se resuspende en PBS sin glucosa, Ca^{++} ni Mg^{++} , para evitar la activación celular.

Para una mayor purificación celular llevamos a cabo la separación de los eosinófilos que pueden identificarse en base a su carácter de granulocitos CD9 positivo. Por tanto, la preparación de neutrófilos se incubaba con anticuerpos anti-CD9 de ratón (Immunotech-IZASA, Barcelona, España) y posteriormente con anticuerpo IgG de cabra anti-ratón con bolas micromagnéticas (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Alemania). Neutrófilos y eosinófilos son separados tras su paso por una columna imantada, los eosinófilos con bolas anti-CD9 son fijados a las paredes de la columna, mientras los neutrófilos se desplazan al fondo de la misma.

Una vez aislados los neutrófilos, se procede a su contaje y a la comprobación de su viabilidad.

La viabilidad de las células obtenidas se determina mediante el test de exclusión azul tripan. El azul tripan es un colorante que penetra en células con pérdida de la integridad de sus membranas, apareciendo éstas teñidas de azul al microscopio. La suspensión de células se diluye con PBS (dilución 1:10 ó 1:100). Después, en un tubo se mezclan 80 μl de PBS, 10 μl de esta mezcla y se añaden a una cámara de Neubauer 0.0025 mm^2 . En el microscopio óptico a 40 aumentos se cuentan las células localizadas en las zonas de 4 x 4 casillas de la cámara. Para calcular el número de células y el porcentaje de viabilidad celular, se aplican las siguientes fórmulas:

$$\text{n}^\circ \text{ células/ml} = \text{media de células contadas} \times 10^4 \times \text{dilución (10 ó 100)}$$

$$\% \text{ viabilidad} = (\text{células blancas o no teñidas} / \text{células totales}) \times 100$$

3.4.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS SÉRICAS

a) Material:

- Algodón hidrófilo.
- Alcohol etílico de 96°.
- Micropore.
- Tubo de ensayo con gel separador de suero (BD Vacutainer SST II)

- Palometa
- Centrífugadora
- Tubo de ensayo 12 x 75mm.

b) Procedimiento:

Las muestras séricas las obtenemos mediante venopunción de 20 c.c. de sangre, la cual se recoge en un tubo de ensayo con gel separador de suero (BD Vacutainer SST II). Permitimos que las muestras se coagulen a temperatura ambiente durante 20-30 minutos, hasta que el coágulo se comience a retraer. El suero se centrifuga a 300 rpm durante 10 minutos e inmediatamente después de la centrifugación lo transferimos a un tubo de 12 x 75 mm. Se tapa, lo etiquetamos y se guarda a 4°C.

3.5.- DETERMINACIÓN DE LA IgE ESPECÍFICA

La técnica de cuantificación de IgE se realiza según el método HYTEC 288 Specific IgE EIA, (Hycor Biomedical Inc.-IZASA, Barcelona, España), se trata de un método “*in vitro*” para la determinación en fase sólida de la IgE presente en el suero, utilizando como fase sólida discos de celulosa que llevan acoplados los alergenos de interés.

a) Materiales:

- HYTEC 288 Specific IgE EIA, (Hycor Biomedical Inc.-IZASA, Barcelona, España)
- Solución de lavado (PBS + Triton X100 + Azida sódica al 0,3%).
- Agua destilada.
- Pastillas de paranitrofenil fosfato.
- Solución diluyente de sustrato (solución de cloruro magnésico con dietanolamina),
- Solución de conjugado (Anti IgE humana de ratón conjugada con fosfatasa alcalina).
- Solución de stop (hidróxido de sodio 1N).
- Diluyente de la muestra (suero equino libre de IgE).
- Calibradores a concentraciones estándar conocidas: A 0 UI/ml; B 0,35 UI/ml; C 0,7 UI/ml; D 3,5 UI/ml; E 17,5 UI/ml).

b) Procedimiento:

El fundamento de esta técnica se basa en la presencia de un anticuerpo anti-IgE específico unido de forma covalente a una fase sólida. Dicho anticuerpo, durante el período de incubación necesario, actúa como captador de la IgE específica presente en las muestras, fijándola a dicha fase sólida.

Después de un proceso de lavado para eliminar la IgE no fijada, añadimos un segundo anticuerpo anti-IgE específica, esta vez marcado con una enzima. Todo ello dará lugar a la formación de complejos constituidos por la IgE específica presente en las muestras y dos anticuerpos que se unen a ella: uno que la fija a la fase sólida (captador) y otro que nos va a poner de manifiesto la cantidad de IgE captada (marcador). Después del correspondiente período de incubación y un nuevo proceso de lavado para eliminar el exceso del segundo anticuerpo, añadimos el sustrato sobre el que va actuar la enzima del anticuerpo anti-IgE específica marcador.

Finalmente, después de un último periodo de incubación, agregamos una solución stop que detiene la reacción, procediendo seguidamente a la lectura de la fluorescencia emitida por cada pocillo por un fluorímetro (Flúor 96), el cual, una vez leída la placa, envía los datos obtenidos a un ordenador tipo PC al que se incorpora el programa que controla la información sobre las muestras, así como la lectura e interpretación de los resultados obtenidos. Se procesan los datos y se calcula las concentraciones de IgE específica mediante extrapolación a partir de la curva estándar, construida con los valores obtenidos para los estándares. Las concentraciones quedan expresadas en KU/l.

c) Preparación del material y manejo del mismo:

Después de permitir que los reactivos se atemperen a 20-25°C, se prepara como sigue:

- 125 ml de solución de lavado (PBS + Triton X100 + Azida sódica al 0,3%) se mezclan con 1875 ml de agua destilada.
- Pastillas de paranitrofenil fosfato (sustrato), se diluyen en solución diluyente del sustrato (solución de cloruro magnésico con dietanolamina) para formar la solución de desarrollo.
- Solución conjugado (Anti-IgE humana de ratón conjugada con fosfatasa alcalina), solución de stop (hidróxido de sodio 1N), diluyente de la muestra (suero equino libre de IgE), calibradores a concentraciones estándar conocidas:

A 0 UI/ml; B 0,35 UI/ml; C 0,7 UI/ml; D 3,5 UI/ml; E 17,5 UI/ml): se utilizaron tal y como nos fueron servidos.

En la gradilla de incubación se colocan tubos vacíos que harán de blanco del ensayo, tubos con discos que llevan fijadas anti-IgE que se utilizarán para la realización de la curva patrón y tubos con discos que llevan los alergenitos a estudiar.

En otra gradilla se colocan las muestras séricas de los pacientes a estudiar.

El equipo HYTEC realiza los siguientes pasos automáticamente:

1. Pipetea 50 μ l de calibradores o muestra sérica diluida en cada uno de los tubos que tienen discos con anti-IgE.
2. Incuba 1 hora a 37°C.
3. Lava todos los tubos con solución de lavado.
4. Añade 50 μ l de conjugado a todos los tubos excepto a los blancos.
5. Incuba 30 minutos a 37°C.
6. Vuelve a lavar.
7. Añade 200 μ l de solución de desarrollo en todos los tubos incluyendo los blancos.
8. Incuba 30 minutos a 37°C.
9. Pipetea 400 μ l de solución de stop a todos los tubos incluyendo los blancos.
10. Mide la absorbancia de la solución de color que se desarrolla.
11. Calcula automáticamente los resultados.

3.6.- DISOCIACIÓN DE LAS INMUNOGLOBULINAS DE LA SUPERFICIE DEL NEUTRÓFILO

a) Material:

- Acetato bufer (50mM acetato sódico pH 4, 85mM NaCl, 5mM KCl, 0,03% albúmina de suero humano).
- Hielo.
- Bufer gelatina veronal (GVB) (1,8mM barbital sódico, 3,1 mM ácido barbitúrico, 0,1% gelatina, 0,05 mM MgCl₂, 141 mM NaCl, 0,15 mM CaCl₂, pH 7.3-7.4).
- Centrifugadora.
- 1 N NaOH

b) Procedimiento:

Tras el aislamiento, las células (1×10^8 células) son resuspendidas en 1 cm^3 de acetato bufer e incubadas en hielo durante 3 minutos. Posteriormente se añade el mismo volumen de bufer gelatina veronal (GVB), y la mezcla es centrifugada a 500g durante 10 minutos. Las inmunoglobulinas del sobrenadante se neutralizan con 1 N NaOH. La IgE-específica e IgG específica se determinan por la técnica HYTEC 288 (Hycor Biomedical Inc.-IZASA, Barcelona, España) ya descrita.

3.7.- SECRECIÓN DE LACTOFERRINA ESTIMULADA POR LOS AGONISTAS

Una vez separados los neutrófilos tal y como hemos descrito anteriormente procedimos a la determinación de la lactoferrina secretada por los mismos tras ser estimulados.

a) Material:

- PBS (buffer fosfatado salino).
- Ca^{2+} .
- Suero de ternero fetal (Gibco, Grand Island, NY, USA).
- PAF sintético (PAF-C16, 1-O-hexadecil-2-acetil-sn-glicerol-3-fosforilcolina) (Sigma).
- BSA (albúmina de suero bovino).
- Centrifugadora.

b) Procedimiento:

Los neutrófilos en alícuotas de 2×10^6 células son incubados por triplicado con y sin agonistas, en 0.3ml de PBS, pH 7.4, con $1 \mu\text{mol/l}$ Ca^{2+} y 2% de suero de ternero fetal (Gibco, Grand Island, NY, USA).

Como agonistas usamos PAF sintético (PAF-C16, 1-O-hexadecil-2-acetil-sn-glicerol-3-fosforilcolina) (Sigma) a una concentración final de 10^{-6} mol/l, y los alergenos a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$. El PAF es preparado por disolución en etanol permaneciendo estable varias semanas a -20°C . El disolvente control, que contiene etanol diluido ($\leq 0.025\%$), no se ha detectado que tenga efecto sobre la degranulación de los neutrófilos. La disolución de los alergenos se realizada en PBS, y el PAF en PBS con 1mg/ml de BSA (albúmina de suero bovino). Los alergenos y PAF son preparados justo

antes de su utilización en el laboratorio. Ninguno de los agentes se ha comprobado que afecte la viabilidad de las células a las concentraciones indicadas, tal y como se confirma con la tinción azul tripan.

Después de la incubación a 37°C en baño maría con agitación periódica, las células son enfriadas, y centrifugadas a 700 g durante 5 minutos a 4°C. El fluido sobrenadante se separa y guarda a -70°C para posteriores estudios.

3.8.- DETERMINACIÓN DE LA LACTOFERRINA

La lactoferrina liberada en el sobrenadante del cultivo celular obtenido es medida por el método de Lactoferrina-EIA (Enzima Inmunoensayo (ELISA) para Lactoferrina humana) (BIOXYTECH® Lactof-EIATM Oxis Internacional Inc., Portland, Oregón, EE.UU).

a) Material:

- Bufer diluyente de las muestras (3 x 25 ml): 20 mM de bufer fosfato, pH 7.4, conteniendo 150 mM NaCl, 2 mg/mL de albúmina de suero bovina (BSA), 0.1% Tween-20 y 0.01% merthiolate. Esta solución se usa para diluir las muestras biológicas.
- Lactoferrina estándar (300 ng de lactoferrina purificado liofilizada).
- Solución de lavado (100 ml, concentrada 20x): 1M de bufer Tris-HCl, pH 7.8, que contiene 3M NaCl, 2% Tween-20 y 0.01% merthiolate.
- Solución anti-Lactoferrina: 75 µl de solución concentrada de anticuerpo monoclonal a Lactoferrina en 20 mM bufer fosfato, pH 7.4, conteniendo 150 mM NaCl, 2 mg/mL BSA, 25%, glicerol y 0.01% merthiolate en un microtubo.
- Avidin-HRP (peroxidasa): (1 microtubo) 75 µl de solución concentrada de acoplador ávido de la biotina en 50mM bufer de Tris-HCl, pH 8.0, conteniendo 20 mg/ml BSA y 0.01 merthiolate en un microtubo.
- Bufer diluyente: 3 x 8 ml. 20mM bufer fosfato, pH 7.4, conteniendo 1.50 mM NaCl, 20 mg/ml BSA, 0.1% Tween-20 y 0.01% merthiolate.
- OPD sustrato: cada tableta contiene 20 mg de OPD.

- OPD bufer diluyente: 1 x 20 ml. 100 bufer citrato, pH 5.5, conteniendo 0.012% H₂O₂ y 0.01% merthiolate.
- Solución de stop: 1 x 6 ml. 1 M solución de H₂SO₄.
- Microplacas divididas en 3 secciones: Cada sección contiene 2 tiras de microplacas con 16 pocillos. Además la caja incluye un marco para sostener las tiras de microplacas, y 12 hojas del papel adhesivo.
- Agua desionizada.
- Tubos de ensayo.
- Pipetas graduadas (100-1000 µl) (Finnipipete).
- Distribuidores automáticos (50 y 100 µl).
- Espectrofotómetro de 420 nm.

b) Procedimiento:

El método de Lactoferrina-EIA (inmunoanálisis) es un análisis de inmunoabsorción unido a enzima ó ELISA. Se incuban las muestras en los pocillos de una microplaca, que han sido revestidos con un primer anticuerpo monoclonal a lactoferrina. El complejo lactoferrina-MAb (anticuerpo monoclonal) se detecta por un segundo anticuerpo monoclonal marcado con biotina frente a lactoferrina. El paso final del ensayo es una amplificación basada en un acoplador ávido de la biotina marcado con peroxidasa (avidin-HRP). La cantidad de lactoferrina es medida enzimáticamente, tras la suma de ortofenilendiamina (OPD), por un espectrofotómetro de 420 nm.

c) Preparación del material y manejo del mismo:

Después de permitir que los reactivos se atemperen a 20-25°C, algunos de los reactivos necesitan ser preparados como sigue:

- La lactoferrina estándar (100 ng/mL): Se agrega 3 ml de bufer diluyente de las muestras a la proteína liofilizada. La solución puede guardarse a 2-8°C durante 3 días.
- Bufer de lavado (20x): El bufer de lavado debe diluirse 20 veces antes de usar. El bufer de lavado diluido está estable durante 5 días a temperatura ambiente.
- La solución anti-lactoferrina y avidin-HRP: Estas soluciones deben diluirse 250 veces en bufer diluyente antes de usar.

- Tabletas de OPD: 5 minutos antes de su uso, se disuelve el número requerido de tabletas en el bufer diluyente de OPD.

Una vez preparados los reactivos realizamos los siguientes pasos:

A. Preparación del estándar:

- Depositamos 100 μ l de bufer diluyente de las muestras una vez que las muestras han sido diluidas con el mismo en los pocillos a utilizar salvo en el primero. El último de dichos pocillos será el control negativo.
- A continuación depositamos 200 μ l de la solución de lactoferrina estándar en el primer pocillo.
- Seriamos las diluciones: para ello transferimos 100 μ l de cada pocillo en el próximo y mezclamos despacio con la pipeta evitando la formación de espuma hasta el penúltimo de los pocillos. Es recomendable cambiar las puntas de la pipeta después de cada uno de los traslados.
- Cubrimos los pocillos con papel del adhesivo y se incuba a 37°C durante 1 hora.

B. Incubación con anti-lactoferrina

- Se prepara el volumen requerido de solución de anti-lactoferrina diluida.
- Se vacía la microplaca y se lavan los pocillos 5 veces con el bufer de lavado.
- Eliminamos la solución de lavado residual con papel absorbente.
- Ponemos 100 μ l de solución diluida de anti-lactoferrina en cada uno de los pocillos hasta el penúltimo.
- Cubrimos los pocillos con el papel del adhesivo y se incuban a 37°C durante 1 hora.

C. Incubación con Avidin-HRP

- Preparamos el volumen requerido de solución de Avidin-HRP y a continuación repetimos los pasos anteriores salvo que en esta ocasión una vez eliminada el bufer de lavado añadimos 100 μ l de Avidin-HRP diluido en cada uno de los pocillos.
- Cubrir los pozos con el papel del adhesivo e incubar a 37°C durante 15 minutos.

D. Medición Colorimétrica

- Preparamos el volumen requerido de solución de OPD y volvemos a repetir cada uno de los pasos añadiendo en esta ocasión 100 μ l de solución de OPD preparada en cada uno de los pocillos.

- Cubrir los pocillos con papel adhesivo e incubamos a 37°C hasta que la absorbancia del primer pocillo (100 ng/ml estándar) alcance aproximadamente 1-1.5 (de 5 a 10 minutos, dependiendo del lote).
- Añadir 50 µl de solución de stop a cada uno de los pocillos.
- Leemos la absorbancia a 420 nm contra el control negativo.

La curva normal del método de Lactof-EIA se obtiene trazando la absorbancia a 420 nm (ordenada) como una función logarítmica de las concentraciones de lactoferrina normales (abcisa).

Los valores de la muestra son obtenidos entonces por interpolación. Esto puede realizarse automáticamente por el lector ya que el software requerido está disponible. Para la preparación de las muestras estas deben diluirse usando el bufer diluyente de las muestras. Para cada determinación se usan 100 µl de las muestras. La presencia de suero de ternero fetal inferior a 20% en el medio de cultivo no interfiere con este ensayo.

3.9.- DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN PULMONAR

El volumen de flujo espiratorio forzada en el primer segundo (FEV₁) es el valor estudiado para valorar la función pulmonar.

a) Material:

- Espirómetro seco (Vitalograph, Buckingham, Reino Unido).
- Pinza nasal.
- Cartucho de cartón para la boquilla.
- Peso y tallímetro.
- Jeringa de calibración para espirómetro.
- Termómetro de temperatura ambiente.

b) Procedimiento:

La prueba fue realizada con el paciente en sedestación, con la nariz tapada con una pinza, para que el paciente respire por la boca a través del espirómetro. Iniciamos la prueba dándoles instrucciones, y explicándoles el método, que consiste en hacer que el paciente realice una inspiración lenta y máxima, seguida de 2-3 segundos de apnea y luego una espiración lo más rápida y prolongada posible. Repetíamos la prueba hasta obtener al menos 3 curvas espiratorias forzadas con variabilidad $\leq 5\%$ y seleccionábamos la mejor. En la

pantalla del neumotacógrafo, queda reflejado la correspondiente curva flujo-volumen y volumen tiempo, y los parámetros respiratorios: capacidad vital, flujo espiratorio forzado en el primer segundo, índice de Tiffenau, y valores de los mesoflujos, entre otros. Tanto el valor absoluto, como el porcentaje y las mediciones realizadas, las extraemos por impresora.

3.10.- TEST DE PROVOCACIÓN BRONQUIAL

Esta prueba se practica para el estudio de la hiperrespuesta bronquial y consiste en la realización de un número de inhalaciones de concentraciones progresivamente crecientes de metacolina, en el caso del test de provocación bronquial inespecífico, o del alérgeno en la provocación bronquial específica. Sólo llevamos a cabo la realización de dicha prueba en aquellos individuos con un FEV_1 y $FVC \geq 75\%$ del teórico.

El aerosol se genera de manera intermitente mediante un nebulizador De Vilbiss 646 unido a un dosímetro de Rosenthal-French. Con este método un contador-medidor automático libera cantidades convenientes y reproducibles de la sustancia aerosolizable desde un nebulizador. Consta de un circuito electrónico, variable en el tiempo que es usado para abrir una válvula solenoide por un disparador, controlado por un operativo. La válvula abierta permite el paso del aire desde un tanque de aire comprimido hacia el nebulizador en un intervalo determinado por el temporizador del circuito. Con una duración de aerosolización de 0,5 a 0,6 segundos, el dosímetro genera 0,02-0,03 ml. de solución cuando se coloca 0,5-1ml de la solución en el nebulizador.

a) Material:

- Espirómetro seco (Vitalograph, Buckingham, Reino Unido).
- Pinza nasal.
- Cartucho de cartón para la boquilla.
- Nebulizador De Vilbiss 646.
- Dosímetro de Rosenthal-French que nos permite determinar con exactitud la cantidad inhalada, ya que libera una cantidad determinada de aerosol durante un tiempo prefijado (habitualmente 6 mgrs en 0,5 ó 0,6 segundos).
- Como agente farmacológico broncoconstrictor en el test de provocación bronquial inespecífico utilizaremos una solución salina tamponada de Methacholine chloride (CINa 0,5%, CO₃HNa 0,275% y fenol 0,4%) cuyo

pH debe ser cercano a 7 y de la que se hacen diluciones a concentraciones de 5 y 25 mgrs/ml, las cuales serán utilizadas para nuestra técnica de provocación. Utilizamos como agente la metacolina, en base al carácter acumulativo de las dosis administradas.

- En el caso de la provocación bronquial específica utilizamos extractos alergénicos liofilizados por los Laboratorios Bial-Aristegui (Bilbao, España) que se reconstituyen con diluyente. La batería elegida para este estudio consta de los siguientes extractos alergénicos: D. pteronyssinus, Olea europaea, y Artemisia vulgaris.
- Calculadora y cronómetro.
- Solución salina con 0.03% de seroalbúmina humana.
- Aparato portátil tipo Miniwright (peak-flow-meter).

b) Procedimiento:

1. *Test de provocación bronquial inespecífico*: Nos permite conocer la existencia o no de hiperreactividad bronquial inespecífica, por lo que también se le denomina test de hiperreactividad bronquial.

Utilizaremos el método de Townley que emplea una o las dos concentraciones de metacolina mencionadas (5 y 25 mgrs/ml) a las que se mantiene fijas y con las que se hace un número determinado de inhalaciones que se van incrementando progresivamente.

Las inspiraciones se realizan en un periodo de cinco segundos desde capacidad residual funcional a capacidad pulmonar total, conteniéndose la respiración durante unos tres segundos más y midiéndose la respuesta a los 90 segundos. Los intervalos entre las dosis son de tres minutos. Si se precisan varias inhalaciones para llegar a una dosis acumulada determinada, estas se administran de modo consecutivo.

Como unidad de medida en esta técnica se utiliza la unidad inhalatoria (U.I.) o unidad acumulativa (U.A.) que equivale a una inhalación de una concentración de 1 mgrs/1ml, de modo que si se hacen 5 inhalaciones de dicha solución habremos alcanzado una dosis de cinco unidades inhalatorias o acumulativas que se irán sumando a las siguientes que vayamos administrando hasta alcanzar la dosis máxima de 230 U.A., a partir de cuyo momento consideramos el test como negativo.

Como parámetro funcional de medida de la obstrucción bronquial se emplea el VEMS ó FEV₁, permitiéndonos determinar este método la PD20FEV₁-metacolina o dosis acumulativa de metacolina que ocasiona un descenso del 20% del FEV₁ obtenido en la valoración espirométrica basal.

Para obtener estos valores basales, se realizan en primer lugar tres determinaciones espirométricas con el fin de seleccionar el mejor FEV₁ y a continuación colocamos 2 ml de bufer en la cámara de nebulización, le explicamos al paciente cómo debe respirar durante la administración del aerosol, se le ocluye la nariz con una pinza nasal y se administra el aerosol invitándole a que realice 5 inhalaciones. A los 90 segundos de terminar la nebulización, se practican de 2 a 3 nuevas espirometrías, eligiéndose para el análisis la mejor de las mismas, valorándose como parámetro funcional el FEV₁; si no se producen descensos iguales o superiores al 10% en el FEV₁ se continua la prueba con la provocación, considerándose como valores basales de referencia los obtenidos tras la inhalación del PBS. Si por el contrario tras la inhalación del PBS se obtiene un descenso superior se finaliza la prueba y se realiza el test otro día distinto.

En el primero de los casos se procede a la administración de concentraciones progresivas de metacolina, comenzando por la menor (5mgr/ml). En la cámara de nebulización colocamos 2 ml de esa menor dilución de metacolina que se inhala mediante una inspiración lenta de 5 segundos de duración y 3 segundos de apnea, seguida a los 90 segundos de una valoración espirométrica y si no se objetiva descenso \geq del 20% del VEMS se invita a realizar, según el grado de descenso conseguido, nuevas inhalaciones con la misma dilución o bien una inhalación de la concentración mayor (25mgr/ml) de metacolina. Si a los 90 segundos no se produce un descenso del VEMS \geq al 20%, se administran nuevas inhalaciones de esta última concentración después de lo cual se realiza nueva valoración espirométrica para determinar el valor del VEMS, alcanzándose finalmente como máximo, la dosis acumulativa de 230 U. Si alcanza esta dosis no se ha logrado un descenso igual o superior al 20% consideramos el test como negativo.

En los test positivos se elaboran curvas dosis-respuesta en papel semilogarítmico, colocando en el eje de las ordenadas los valores del FEV₁ expresados en % respecto de su valor tras la inhalación del PBS y en el eje de las abscisas las sucesivas dosis

administradas expresadas en U.A. Si se toman logaritmos en las abscisas, se facilita la representación, dado el amplio margen de respuesta de los distintos individuos. Por extrapolación lineal entre la dosis causante de un descenso en el FEV₁ superior a un 20% y el descenso producido por la dosis inmediata anterior, se calcula la dosis que causa el descenso del 20% en el FEV₁ o PD20 FEV₁.

2. *Test de provocación bronquial específico:* A partir del extracto madre se realizan diluciones a 1/5, 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1.000, 1/5.000, 1/10.000 que serán utilizadas el mismo día de su preparación. Como diluyente se utilizará una solución salina con 0,03% de seroalbúmina humana.

Se inicia el test con la administración de 5 inhalaciones del diluyente utilizado. Transcurrido 10 minutos se realizará un control espirométrico para tomar del mismo el valor del FEV₁ como referencia basal para calcular sus posteriores descensos en el transcurso de la provocación con las diferentes diluciones del alérgeno. Si tras la inhalación del diluyente se producen descensos en el FEV₁ iguales o superiores al 10%, se pospone la prueba.

El paciente realizará 5 inhalaciones sucesivas de cada una de estas diluciones mediante inspiraciones que se realizan desde capacidad residual funcional hasta capacidad pulmonar total, seguida de unos tres segundos de apnea.

La primera concentración del alérgeno a administrar será la representada por la dilución 100 veces superior a la mínima del prick con la que se obtiene respuesta positiva. Si a los 10 minutos no se producen descensos en el FEV₁ iguales o superiores al 10% pero menores al 20%, se administra la siguiente dilución más concentrada. Así sucesivamente hasta llegar a la concentración madre. Pero si tras la administración de una dilución se obtiene descensos en el FEV₁ entre el 10% y el 19%, se esperan 10 minutos para realizar otro control espirométrico. Si tras este periodo se mantiene el mismo descenso, se administrará la concentración superior. Si tras la administración de una dilución se producen descensos en el FEV₁ iguales o superiores al 20%, se considera el test positivo, no utilizándose diluciones más concentradas.

Tras una positividad o tras llegar a la dilución más concentrada, aún sin obtener respuesta positiva, se mantendrán los controles espirométricos horarios hasta las 8

horas de haber administrado el extracto con el fin de detectar posibles respuestas tardías.

Si el test de provocación bronquial específico era positivo en lectura inmediata podíamos tratar la reacción con β_2 inhalados. El uso de β_2 estimulantes no va a inhibir una respuesta tardía.

Paralelamente a las maniobras espirométricas, el paciente realiza una medición del PRF (peak-flow) mediante un aparato portátil tipo Miniwright (peak-flow-meter). Finalizado el test el paciente sigue midiéndose cada 2 horas el PFR hasta completar las primeras 24 horas.

3.11.- MÉTODO ESTADÍSTICO

Utilizamos como valor para comparar los resultados obtenidos en las diferentes determinaciones realizadas, la media y el error estándar de la media.

Empleamos como estudio estadístico para el análisis comparativo de las poblaciones estudiadas, la t-Student no apareada, considerando como significativo su valor, cuando $p \leq 0,05$.

Para el estudio estadístico de la asociación lineal entre dos variables de un mismo individuo y su sentido (si es directo o inverso), empleamos el coeficiente de correlación r de Pearson.

RESULTADOS

4.1.- SELECCIÓN DE PACIENTES

El grupo de pacientes seleccionados ha quedado constituido por 102 individuos, de los cuales 17 son los controles voluntarios sanos no atópicos, 17 los sujetos alérgicos no sensibles, con test cutáneos negativos e IgE específica negativa, a los alérgenos a estudiar, el resto (68 pacientes) son los pacientes atópicos sensibles a los alérgenos estudiados (*Figura 9 A*).

La distribución atendiendo al sexo es de 61 mujeres y 41 hombres (*Figura 9 B*), con edades comprendidas entre los 18 y 50 años.

Los 68 pacientes atópicos sensibles a los alérgenos estudiados quedan agrupados por su patología de la siguiente manera: 17 pacientes padecían rinitis extrínseca y 51 enfermos con asma (*Figura 9 C*) a los cuales dividimos en tres grupos atendiendo a la valoración de la gravedad del asma, según los cuadros establecidos en el GINA, quedando a su vez cada grupo constituido de la siguiente forma: 17 con asma leve persistente, 17 con asma moderado persistente y 17 con asma severo persistente, (*Figura 9 D*).

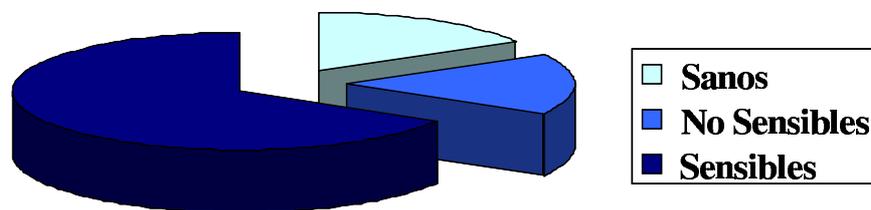


Figura 9A: El total de individuos (102) quedó dividido de la siguiente forma: 17 controles formado por voluntarios sanos y 85 pacientes atópicos, estos a su vez están formado por 17 pacientes atópicos no sensibles a los alérgenos estudiados y 68 pacientes atópicos sensibles.

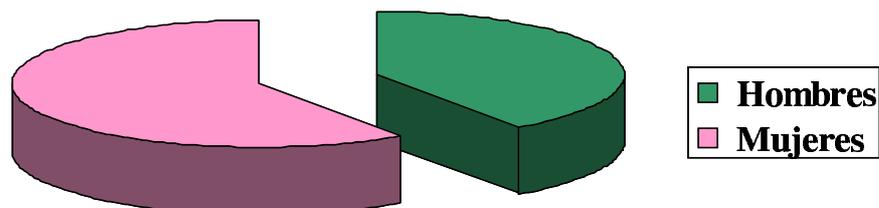


Figura 9B: La distribución por sexo fue de 41 hombres (40%) y 61 mujeres (60%).

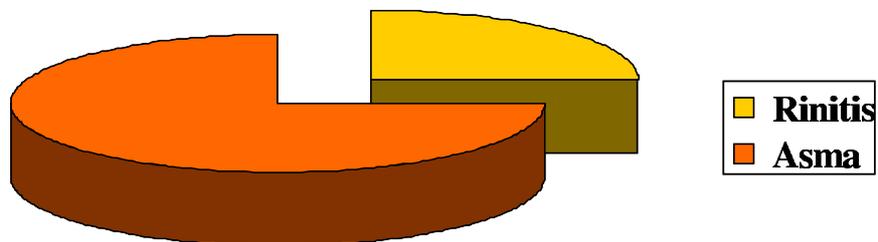


Figura 9 C: La distribución por patología de los 68 pacientes atópicos sensibles es de 17 enfermos con rinitis y 51 con asma.

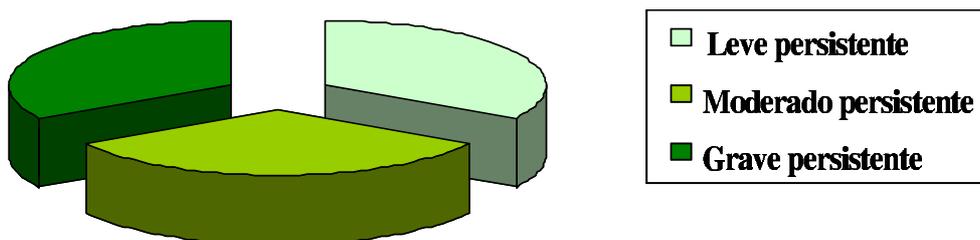


Figura 9 D: La distribución por gravedad de asma es de 17 pacientes con asma leve persistente, 17 pacientes con asma moderado persistente y 17 con asma grave persistente.

4.2.- ESTUDIO DE LA CINÉTICA: DOSIS Y TIEMPO PARA LA LIBERACIÓN DE LA LACTOFERRINA POR LOS NEUTRÓFILOS ESTIMULADOS

Los neutrófilos de los pacientes asmáticos fueron estimulados con el alérgeno al cual eran específicamente sensibles midiéndose la liberación de lactoferrina en el sobrenadante celular. Las *Figuras 10 A y B* ilustran que el tratamiento de los neutrófilos con el alérgeno provocó la liberación de la lactoferrina por los neutrófilos de pacientes que eran específicamente alérgicos a dicho alérgeno, y además como dicha liberación era a su vez dosis (*Fig. 10A*) y tiempo-dependiente (*Fig. 10B*).

Figura 10 A: Para comprobar que dicha liberación era dosis-dependiente tomamos neutrófilos que fueron estimulados con distintas concentraciones (5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/ml}$) de alérgeno al que no eran sensibles ($\text{---}\circ\text{---}$) y posteriormente tomamos el mismo número de neutrófilos y los incubamos con distintas concentraciones de antígeno (5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/ml}$) a los eran sensibles ($\text{---}\bullet\text{---}$). De esta manera pudimos evidenciar como en los neutrófilos no incubados con el alérgeno al cual el paciente era sensible, la liberación de lactoferrina es despreciable al compararla con la lactoferrina liberada por los neutrófilos que son incubados con el alérgeno al que son sensibles, y además pudimos probar en estos últimos como a dosis creciente de alérgeno la liberación era mayor, pero una vez superada la dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ decrece la liberación de lactoferrina, por tanto podemos deducir que dicha cifra es la cantidad de alérgeno que produce una óptima liberación de lactoferrina, siendo esta la concentración que ha demostrado ser la más apta para la estimulación de los neutrófilos de las analizadas tras los diversos ensayos practicados.

Figura 10 B: Del mismo modo para demostrar que a su vez dicha liberación era tiempo-dependiente tomamos neutrófilos no estimulados con el alérgeno al que son sensibles ($\text{---}\circ\text{---}$) y neutrófilos incubados con el alérgeno (10 $\mu\text{g/ml}$) al que eran sensibles ($\text{---}\bullet\text{---}$) y los incubamos a diferentes tiempos (10, 20, 30, 40 minutos). Observamos como a medida que aumentamos el tiempo de incubación la cifra de lactoferrina liberada en las células estimuladas con el alérgeno aumenta, alcanzándose la cifra más alta a los 30 minutos de incubación para posteriormente decrecer, mientras que no se observan diferencias significativas en las células no estimuladas con el alérgeno.

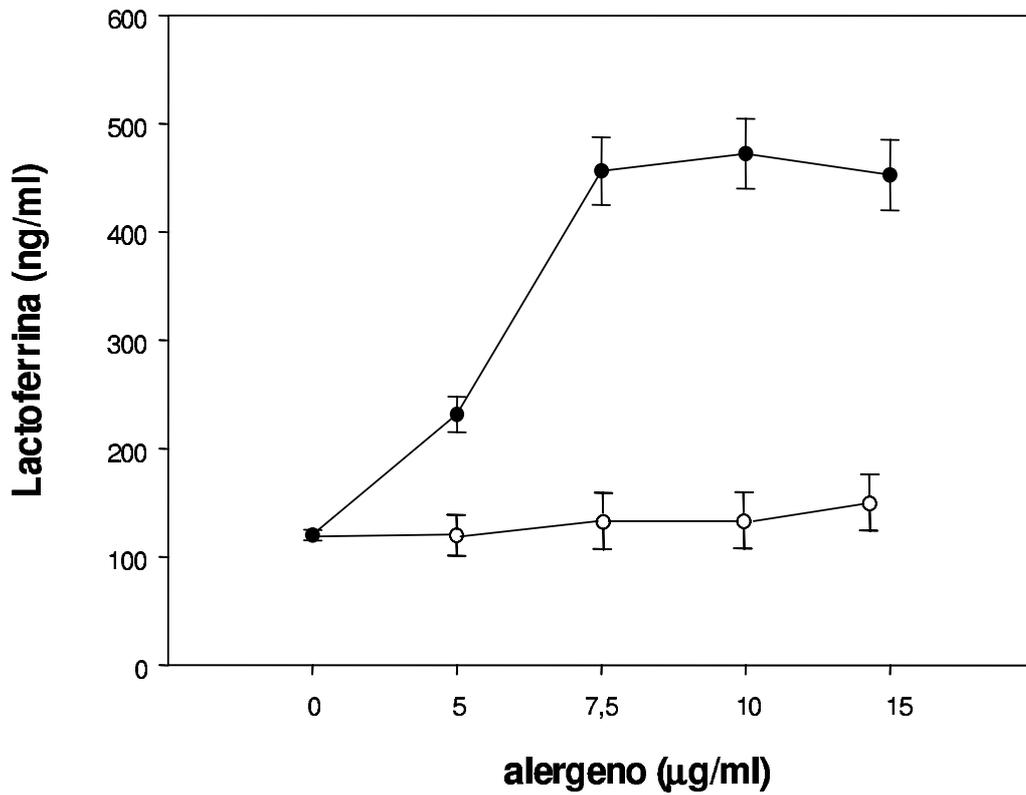


Figura 10 A: Estudio dosis-dependencia de la producción de lactoferrina después de la incubación de los neutrófilos con el alergeno al que son sensibles (●) comparándolo con neutrófilos incubados con un alergeno al que los pacientes no son sensibles (○).

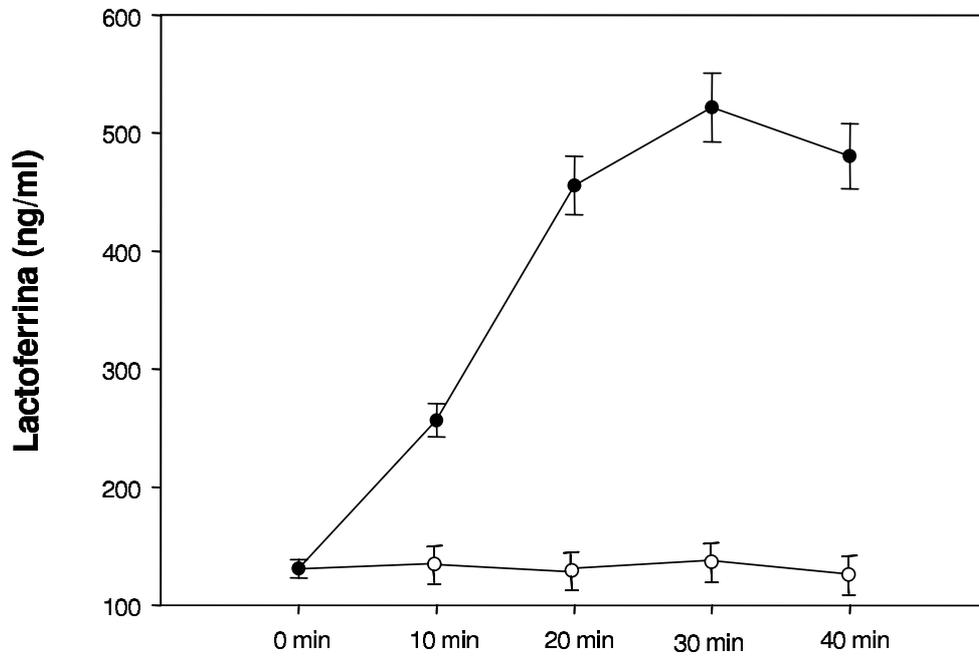


Figura 10 B: Cinética tiempo-dependiente de la producción de lactoferrina después de la incubación de los neutrófilos con el alérgeno al que son sensibles (●) comparándolo con neutrófilos incubados con un alérgeno al que los pacientes no son sensibles (○).

4.3.- ESPECIFICIDAD DE LA RESPUESTA A LOS ALERGENOS

Para determinar la especificidad de la liberación de la lactoferrina, es decir que la lactoferrina es liberada cuando estimulamos los neutrófilos con los alergenos a los cuales son específicamente alérgicos, decidimos estudiar la liberación de la lactoferrina en las células después de 30 minutos de incubación, en diferentes condiciones:

- Neutrófilos de pacientes asmáticos estimulados con el alergeno al que son sensibles.
- Neutrófilos de pacientes asmáticos estimulados con un alergeno al que los pacientes no estaban sensibilizados.
- Neutrófilos de controles sanos.

Pudimos demostrar como la liberación de lactoferrina era bastante superior en las células de los pacientes atópicos incubadas durante 30 minutos con el alergeno al que son sensibles, al compararla con la lactoferrina liberada por los neutrófilos de los controles sanos, y los neutrófilos de pacientes atópicos estimulados con un alergeno al que no están sensibilizados. Por tanto podemos concluir que la liberación de lactoferrina sí es una reacción específica y depende de la existencia de sensibilidad al alergeno testado, ya que sólo los neutrófilos incubados con el alergeno específico responsable del cuadro clínico de los pacientes eran capaces de liberar la lactoferrina, no ocurriendo esto mismo cuando se estimulan los neutrófilos con el alergeno al que el paciente no es sensible, ni en controles sanos, ya que en ningún de estos dos últimos casos se pudo demostrar una liberación significativa de lactoferrina al medio.

Figura 11 A: Los neutrófilos del grupo de pacientes atópicos estimulados con el alergeno al que eran sensibles mostraron una producción significativamente más alta de lactoferrina que las células de los controles sanos ($p < 0.001$) ó las células de los pacientes atópicos incubadas con un alergeno al que los pacientes no estaban sensibilizados ($p < 0.001$).

No se observó diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de lactoferrina liberada por las células de los controles sanos y la liberada por las células de sujetos alérgicos no sensibilizados al alergeno ($p = 0.262$).

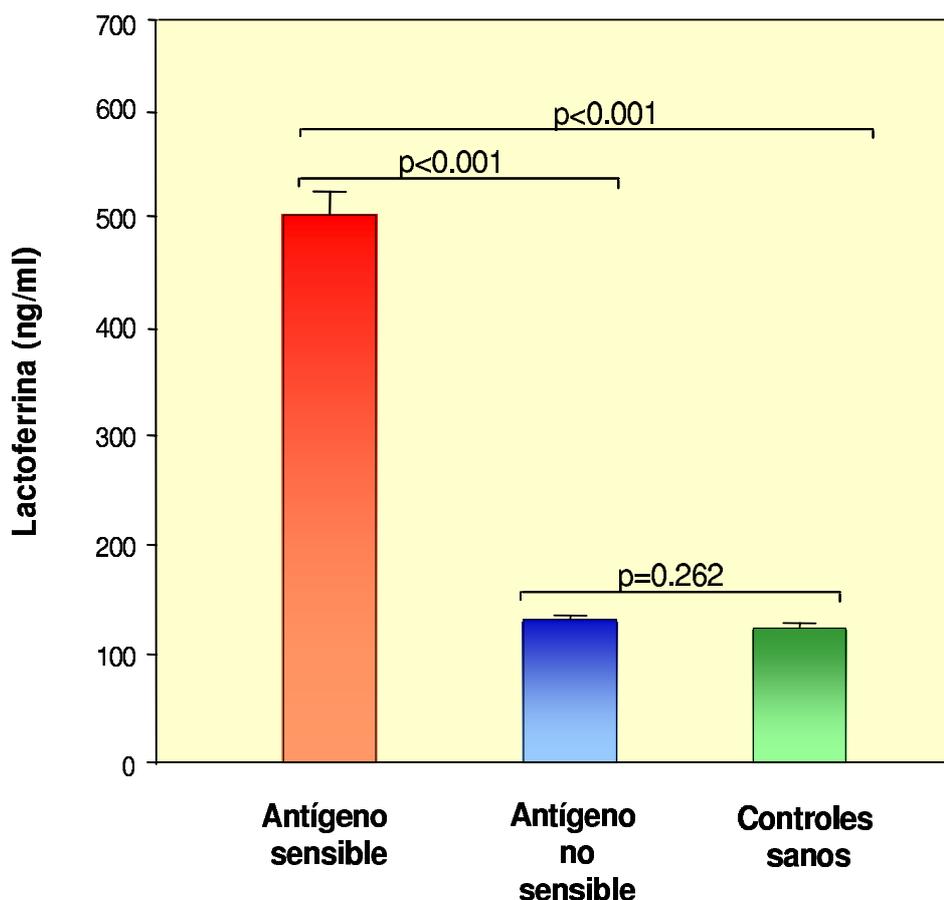


Figura 11 A: Estudio de la especificidad de la liberación de lactoferrina por los neutrófilos

En el caso de los neutrófilos estimulados con alérgenos a los cuales no eran sensibles y en neutrófilos de controles sanos, al no demostrarse liberación de lactoferrina, nos podíamos preguntar si la falta de liberación es debido a una alteración de las células. Por ello, estimulamos las células de ambos grupos con PAF y pudimos comprobar como sí liberaban lactoferrina. Existe una diferencia significativa ($p < 0,001$) entre la lactoferrina liberada por las células incubadas con PAF y las células incubadas con el antígeno al que no son sensibles y las células de los controles sanos, no existiendo diferencia significativa ($p = 0,051$) entre la lactoferrina liberada por los neutrófilos tratados con el antígeno al que son sensibles y los neutrófilos incubadas con PAF, **Figura 11 B.**

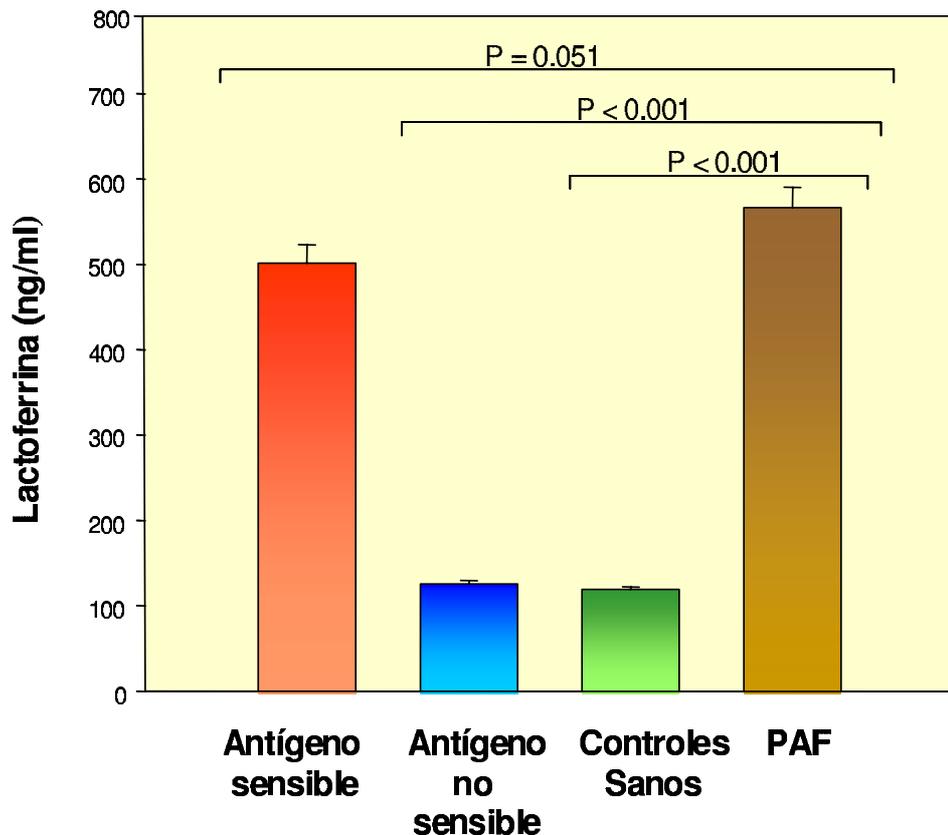


Figura 11 B: Liberación de lactoferrina por los neutrófilos de pacientes alérgicos y controles incubados con PAF.

Para descartar que en las células no estimuladas con antígeno pudiera existir una liberación de lactoferrina significativa, comparamos la lactoferrina liberada por los neutrófilos no estimulados con la lactoferrina liberada por los neutrófilos estimulados de controles sanos, de pacientes atópicos no sensibles y pacientes atópicos sensibles. Pudimos evidenciar como la lactoferrina liberada por los neutrófilos no estimulados es similar a la lactoferrina liberada por las células de los controles sanos estimuladas con el antígeno y la lactoferrina liberada por los neutrófilos de pacientes atópicos no sensibles a dicho alérgeno, mientras que si se evidenciaba una diferencia significativa entre las lactoferrina liberada de las células no estimuladas y las estimuladas con el alérgeno al que eran sensible, **Figura 11 C**.

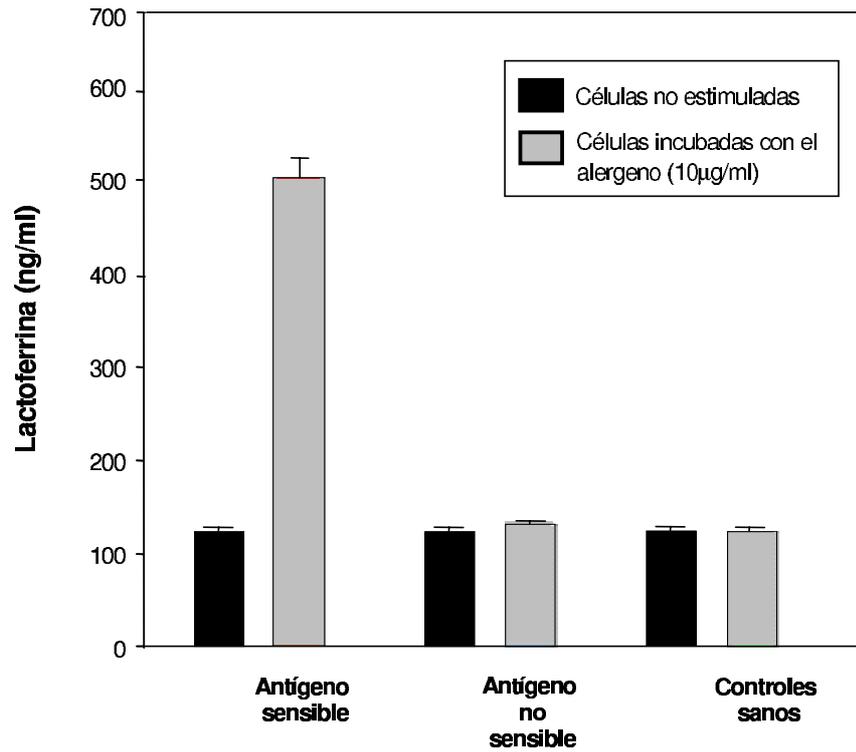


Figura 11 C: Comparación entre la lactoferrina liberada por los neutrófilos no estimulados con el antígeno y la lactoferrina liberada por los neutrófilos incubadas con el antígeno (10µg/ml) tanto de controles sanos, como de pacientes atópicos sensibles y no sensibles

4.4.- RELACIÓN ENTRE LA IgE-ESPECÍFICA SÉRICA Y LA LACTOFERRINA LIBERADA POR LOS NEUTRÓFILOS TRAS EL ESTÍMULO ALERGÉNICO ESPECÍFICO

Una vez demostrada que la liberación de lactoferrina es específica, dosis y tiempo-dependiente, nos queda establecer que esta liberación es mediada por un mecanismo IgE dependiente, por lo que nuestro siguiente paso es demostrar como la respuesta al alergen en los neutrófilos de los pacientes alérgicos está directamente relacionado con un mecanismo IgE mediado.

Pudimos comprobar como sólo los neutrófilos de los pacientes con test cutáneos e IgE específica positiva al alergen estudiado tenían en la superficie celular del neutrófilo IgE específica positiva al alergen, y que tras la incubación con el mismo, solo en estos neutrófilos se demostró una liberación significativa de lactoferrina. Por lo tanto parece ser que la IgE específica de la superficie celular del neutrófilo era la responsable de la liberación de la lactoferrina a través de un mecanismo IgE-dependiente. En ningún caso se encontró IgG específica ni en el suero ni en sobrenadante proveniente de la elución de las inmunoglobulinas de la superficie de los neutrófilos, por lo que descartamos la participación de la IgG. Evidentemente, ni los sujetos sanos controles ni los pacientes atópicos con test cutáneos e IgE específica negativos al alergen estudiado, poseen IgE y/o IgG específica ni en suero ni en líquido de elución.

Aunque no lo hemos recogido, la IgE específica eluida de la superficie celular de los neutrófilos de los pacientes atópicos incubados con el alergen al que son sensibles se corresponde de forma absoluta con la cantidad de IgE específica del suero de estos pacientes ($r=1$). Además comprobamos como a medida que las cifras IgE específica sérica aumentan también lo hace la cantidad de lactoferrina liberada por los neutrófilos tras el estímulo alérgico específico (**Figura 12**), lo que refuerza aún más el papel de la IgE en la liberación de lactoferrina. Pero a pesar de ello, esta última correlación no es absoluta, lo que indica que aunque la liberación es un mecanismo dependiente de la cantidad de esta inmunoglobulina, pueden existir también otros factores que influyen en los niveles de lactoferrina secretada por los neutrófilos de los pacientes atópicos cuando se estimulan con el alergen al que son sensibles.

Figura 12: Representa la existencia de una correlación positiva entre los valores de los niveles séricos de IgE específica y la cantidad de lactoferrina liberada por los neutrófilos una vez incubados con el alérgeno al que el paciente es sensible siendo el coeficiente de correlación de Pearson de $r = 0,649$ y $p = 0,004$.

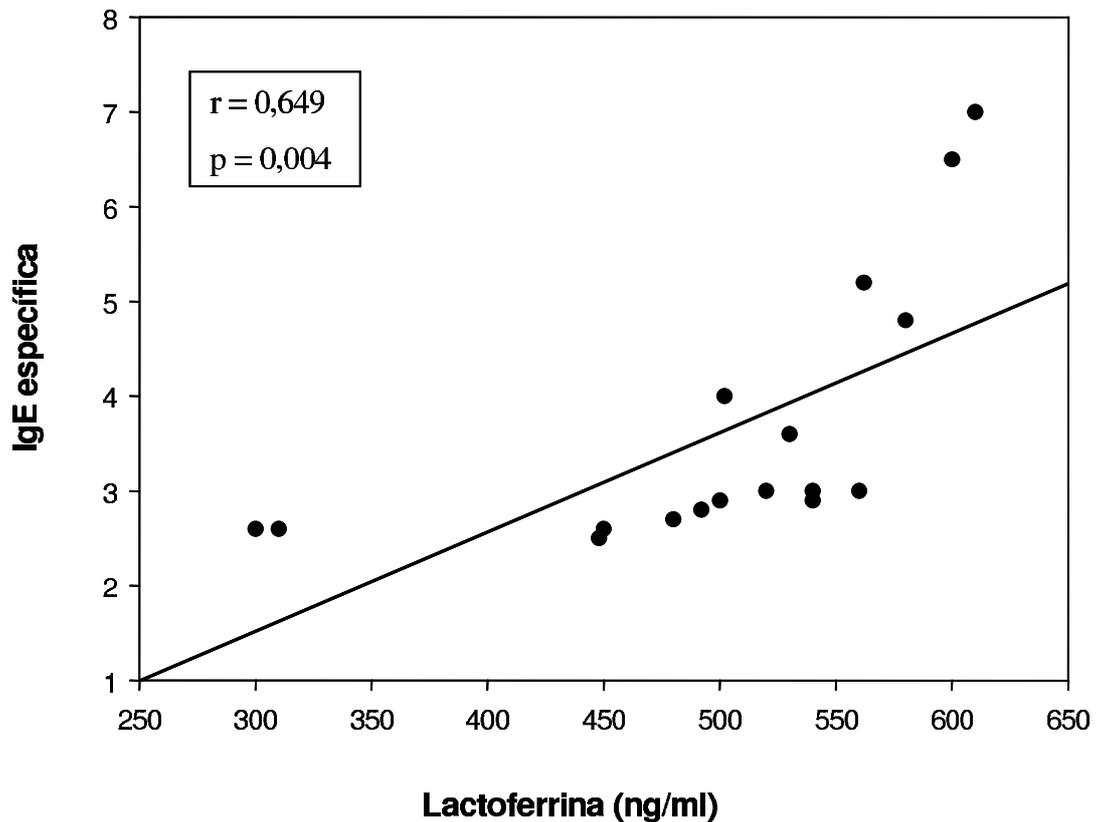


Figura 12: Correlación entre los niveles séricos de IgE específica y la cantidad de lactoferrina liberada por los neutrófilos de pacientes atópicos sensibles al alérgeno con el cual fueron incubados.

4.5.- RELACIÓN ENTRE LA LACTOFERRINA LIBERADA POR LOS NEUTRÓFILOS Y LA CLÍNICA DE LOS PACIENTES ATÓPICOS (RINITIS/ASMA)

Como todos los estudios realizados hasta el momento habían sido realizados en pacientes alérgicos asmáticos se podía pensar que quizás estos hallazgos sólo se lograban encontrar en células procedentes de este tipo de enfermos, lo que podría conducir a la idea de que los citados hallazgos son debidos al carácter asmático del paciente y no por una condición atópica.

Para comprobar si esto pudiera ser así hemos estudiado la liberación de lactoferrina por los neutrófilos estimulados con el alérgeno al que son sensibles tanto en pacientes con asma bronquial como en pacientes con rinitis extrínseca (*Figura 13*).

Cuando estimulamos los neutrófilos en ambos grupos de pacientes, observamos como no había diferencias significativas en la lactoferrina secretada en ambos casos. Esto demuestra que nuestros hallazgos son consecuencia del carácter atópico de los pacientes e independientes del cuadro clínico (rinitis/asma) de estos. Por supuesto, todos los estudios se llevaron a cabo en pacientes que no presentaban en el momento del estudio ninguna sintomatología clínica.

Figura 13: Comparamos la lactoferrina liberada por los neutrófilos sensibles al alérgeno tras su incubación con el mismo en los pacientes atópicos asmáticos y con rinitis extrínseca, y se objetiva como no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,635$) entre los dos grupos.

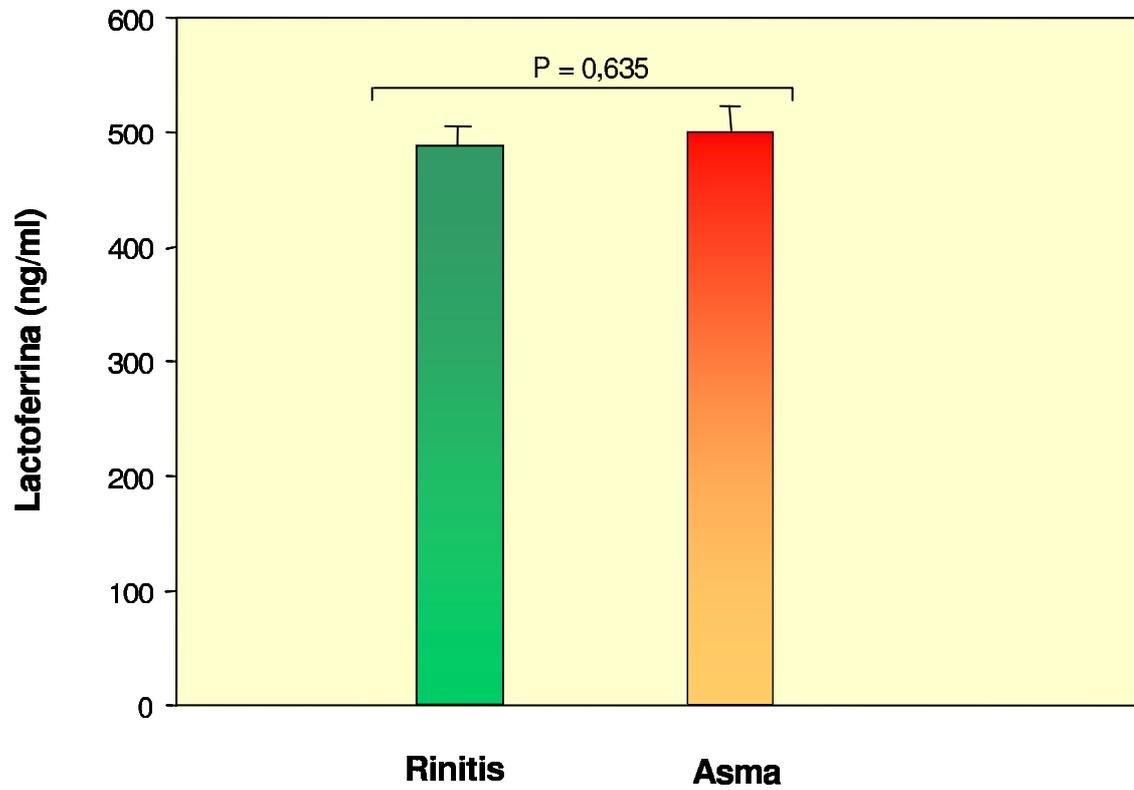


Figura 13: Comparación entre la lactoferrina secretada por los neutrófilos estimulados con el alérgeno al cual son sensibles de pacientes atópicos asmáticos y la secretada por los neutrófilos de los pacientes atópicos con clínica de rinitis.

4.6.- ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE LACTOFERRINA POR LOS NEUTRÓFILOS ESTIMULADOS POR DIFERENTES ALERGENOS A LOS CUALES SON SENSIBLES

Para descartar que sólo se pudiera producir la liberación de lactoferrina tras la estimulación de los neutrófilos con un único alergeno, decidimos estudiar la lactoferrina secretada tras la estimulación de los neutrófilos con diferentes alergenos a los cuales los pacientes eran sensibles. De esta manera pudimos comprobar como la secreción de lactoferrina no se produce específicamente con un solo alergeno sino tras la estimulación de los neutrófilos con cualquiera de los alergenos a los cuales el paciente sea alérgico (*Figura 14*).

Figura 14: Se compara la secreción de lactoferrina tras la estimulación de los neutrófilos con tres alergenos a los cuales los pacientes alérgicos comprobándose como no existen diferencias estadísticas significativas entre ellos ($p = 0,702$; $p = 0,637$; $p = 0,877$), por lo que podemos deducir que la liberación de lactoferrina por los netrófilos de pacientes atópicos es similar cuando se estimulan con difrentes alergenos siempre que son sensibles a los mismos.

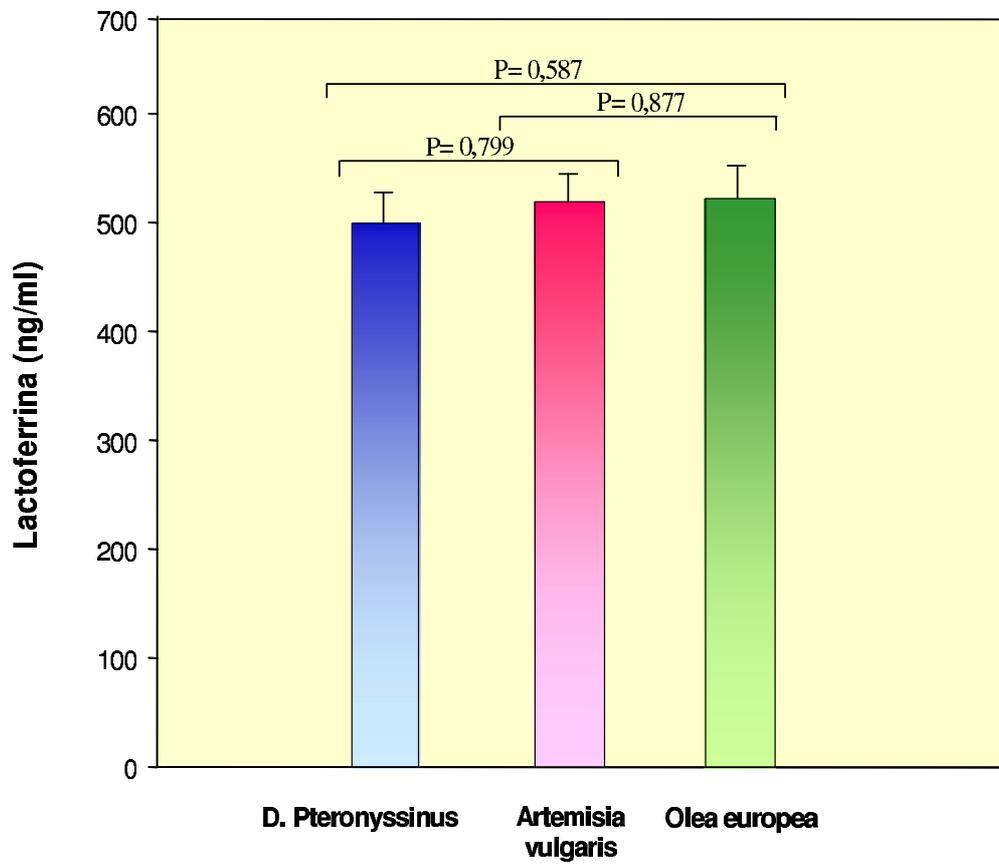


Figura 14: Comparación entre la cantidad de lactoferrina liberada por los neutrófilos tras su estimulación con diferentes alérgenos a los cuales los pacientes son sensibles.

4.7.- RELACIÓN ENTRE LA FUNCIÓN VENTILATORIA PULMONAR DE LOS PACIENTES Y LA DEGRANULACIÓN DE NEUTRÓFILOS

Posteriormente con la finalidad de aclarar si la liberación de lactoferrina por los neutrófilos de pacientes alérgicos se relaciona de alguna forma con la función ventilatoria pulmonar, y por lo tanto aclarar a su vez el papel de los productos secretados por el neutrófilo, tras la degranulación, sobre la función respiratoria, estudiamos la correlación entre la cantidad de lactoferrina liberada por el neutrófilo después de la incubación con los alérgenos y la función pulmonar de los pacientes, midiendo el FEV₁.

Una vez estudiada la función ventilatoria midiendo el FEV₁ de los pacientes, pasamos a valorar la cantidad de lactoferrina liberada por los neutrófilos de los mismos tras la incubación con el alérgeno al cual eran sensibles, y encontramos que existe una relación inversa entre la liberación de lactoferrina y el FEV₁ de los mismos pacientes, es decir que cuanto menor era el FEV₁ mayor era la liberación de lactoferrina y viceversa, a medida que ascienden los valores de FEV₁ menor es la cantidad de lactoferrina secretada (*Figura 15*).

Esto significaría que la liberación de lactoferrina estaría relacionada con las pruebas funcionales respiratorias. Lo que corrobora el posible papel del neutrófilo en el deterioro de la función respiratoria en los pacientes con asma bronquial extrínseco.

Figura 15: Estudio de la cantidad de lactoferrina liberada por los neutrófilos después de 30 minutos de incubación con el alérgeno, con respecto a la función ventilatoria pulmonar de los pacientes, midiendo la FEV₁. Se comprueba una correlación inversa significativa entre la secreción del lactoferrina y la función ventilatoria pulmonar ($r = -0.632$; $p = 0.006$).

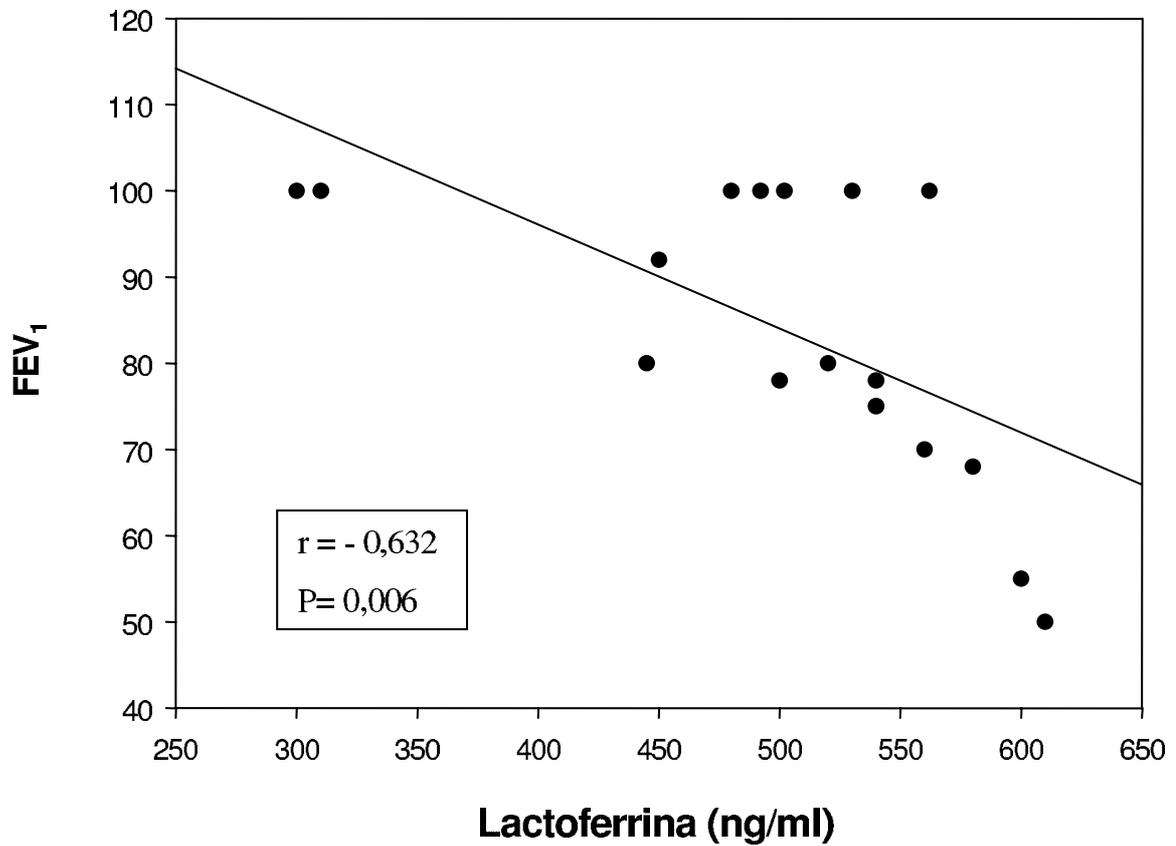


Figura 15: Relación entre la función ventilatoria pulmonar de los pacientes y la degranulación de neutrófilos

4.8.- RELACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE LACTOFERRINA CON EL GRADO DE RESPUESTA BRONQUIAL TRAS LA PROVOCACIÓN INESPECÍFICA

Una vez comprobada la existencia de una relación entre la liberación de lactoferrina y la función ventilatoria pulmonar, pasamos a comprobar si existían cambios en la secreción de lactoferrina pasadas 3 horas de la provocación bronquial inespecífica, realizando esta provocación en sujetos con un asma intermitente sin sintomatología al menos 4 semanas antes y que no estaban tomando ninguna medicación en la actualidad (*Figura 16*).

Figura 16: Hemos podido comprobar que tras la provocación bronquial con suero fisiológico y con metacolina no existen variaciones en la liberación de lactoferrina entre la determinación antes de la provocación y después de la misma, tanto en el caso de utilizar suero fisiológico ($p = 0,810$), como en el caso de la provocación bronquial con metacolina ($p = 0,937$).

Al comparar la lactoferrina secretada después de la provocación bronquial con suero y con metacolina no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,456$).

Es normal que si se realiza una provocación con suero fisiológico no se obtengan diferencias en los valores basales. Esto mismo hemos comprobado al realizar el test de provocación con metacolina, a pesar de la positividad de esta última prueba en pacientes que estaban libres de síntomas, indicándonos que no existe relación entre la hiperreactividad bronquial inespecífica y la liberación de lactoferrina.

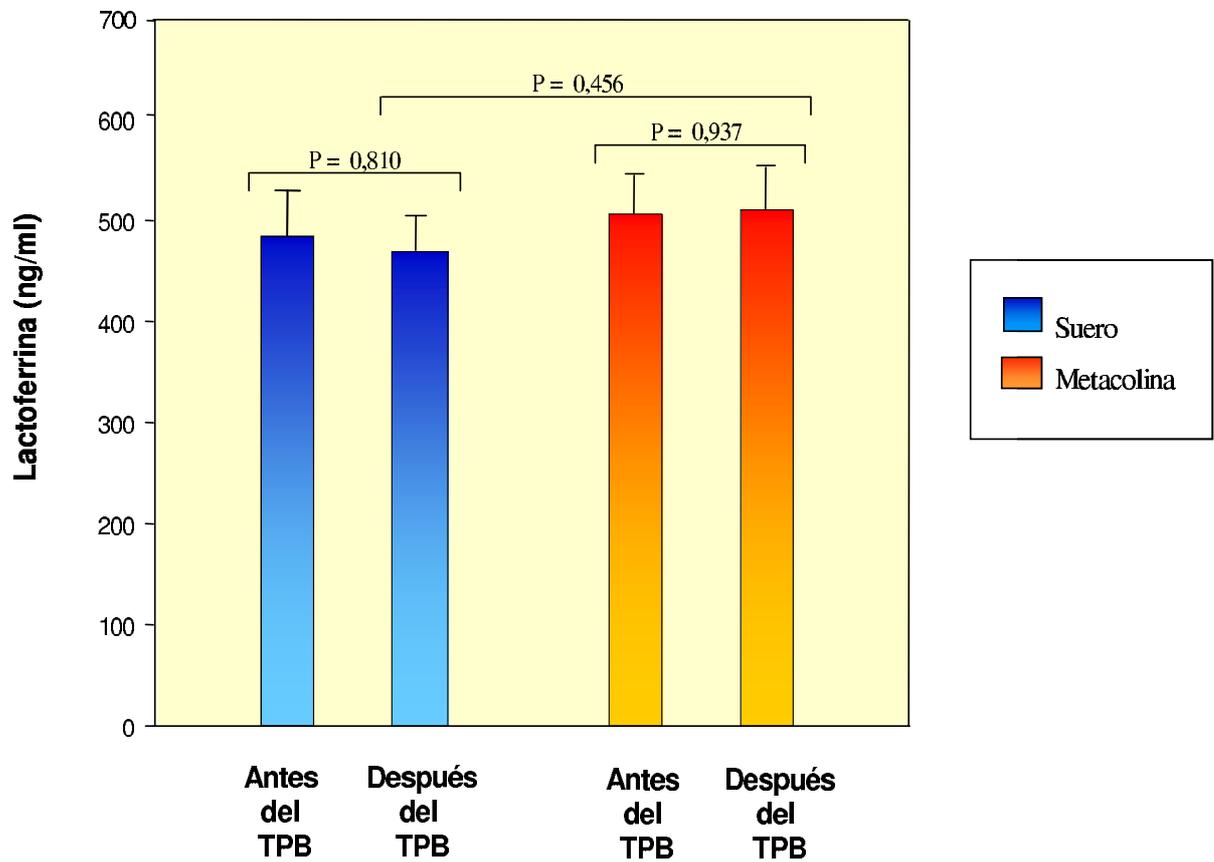


Figura 16: Estudio de la lactoferrina secretada antes y después de la provocación bronquial inespecífica.

4.9.- RELACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE LACTOFERRINA CON EL GRADO DE RESPUESTA BRONQUIAL TRAS LA PROVOCACIÓN ESPECÍFICA

Posteriormente pasamos a determinar que efectos tenía la provocación bronquial específica sobre la liberación de lactoferrina. Hay que tener en cuenta que en los pacientes alérgicos, la provocación bronquial con un alérgeno induce una respuesta inmediata, que puede ser seguida en cierto número de pacientes de una respuesta tardía.

Al realizar la provocación específica con alérgenos observamos como existe una mayor liberación de lactoferrina, estadísticamente significativa, entre los valores anteriores a la provocación y posteriores a la misma, tanto si el paciente ha tenido sólo una respuesta inmediata como si la ha tenido dual, inmediata y tardía (*Figura 17*). Bien es cierto que cuando existe una reacción tardía las determinaciones posteriores a la provocación son estadísticamente más elevadas que si sólo se obtiene una reacción inmediata.

Es evidente que nuestros hallazgos son más relevantes en el caso de existir una reacción tardía. No es de extrañar, puesto que esta reacción está condicionada por la presencia de células efectoras secundarias como son los eosinófilos y los propios neutrófilos.

Figura 17: Al comparar la lactoferrina secretada tras la provocación específica comprobamos como existen diferencias en la cantidad de lactoferrina liberada con respecto a las cifras basales tanto en los pacientes que tienen únicamente una respuesta inmediata ($p = 0,002$) como en los pacientes con una respuesta dual ($p < 0,001$). Una vez obtenidos estos resultados decidimos estudiar si existen diferencias entre la lactoferrina liberada antes de la provocación bronquial específica tanto en los pacientes con una respuesta inmediata como en los pacientes con una respuesta dual comprobándose que no existía diferencia en este caso ($p = 0,931$), mientras que si realizamos la comparación entre las cifras de lactoferrina obtenidos después de la provocación bronquial específica en los pacientes con una respuesta inmediata y en los pacientes con una respuesta dual valoración si existen diferencias ($p = 0,007$).

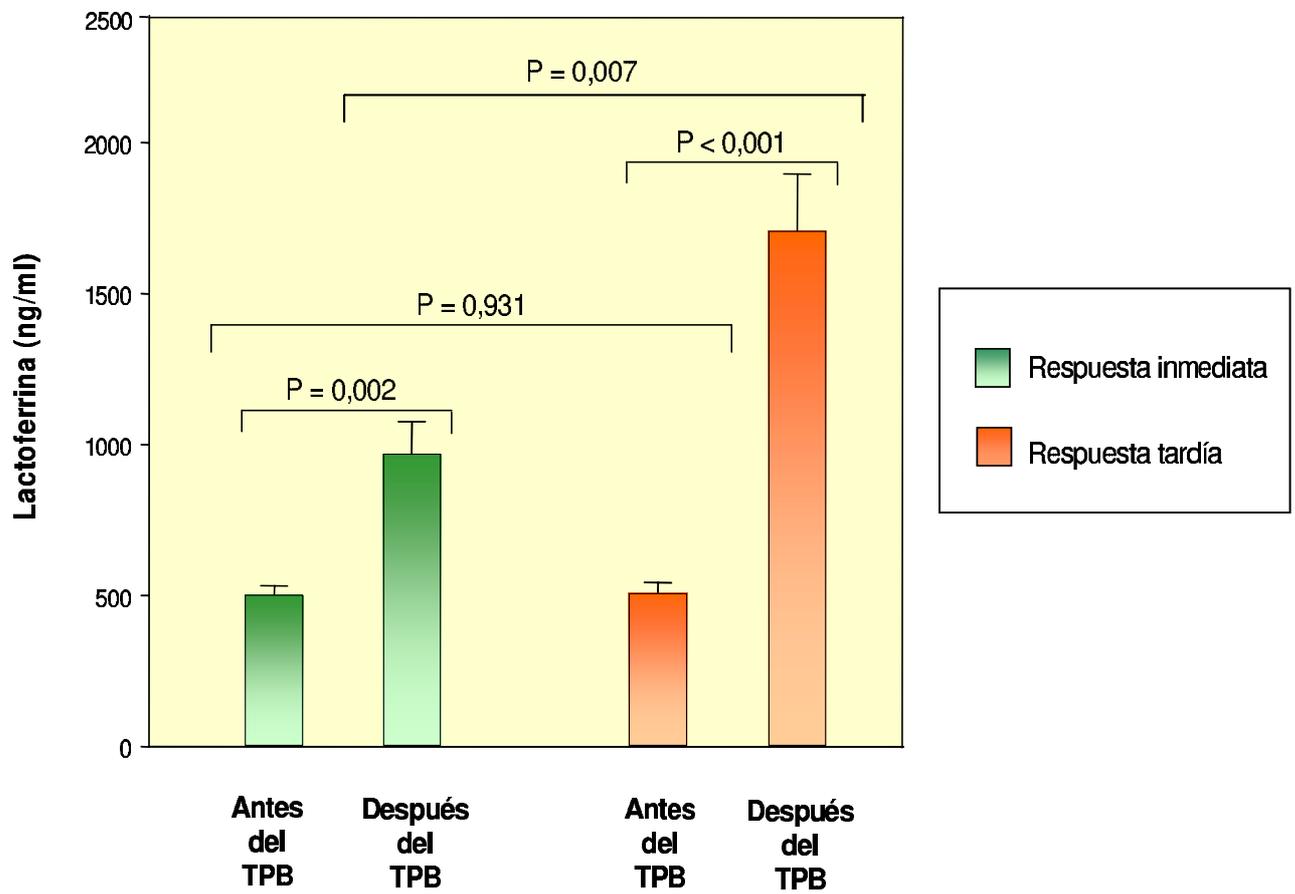


Figura 17: Comparación de la lactoferrina liberada tras la provocación bronquial específica, tanto en pacientes con una respuesta inmediata como en pacientes con una respuesta tardía.

4.10.- RELACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE LACTOFERRINA CON EL GRADO DE SEVERIDAD DEL ASMA BRONQUIAL

Del mismo modo que en los supuestos anteriores, procedimos a estudiar la posible existencia de una relación entre el grado de severidad del asma y la lactoferrina secretada.

Tomando como referencia para la valoración de la gravedad del asma los cuadros establecidos en el GINA (leve intermitente, leve persistente, moderado persistente y severo persistente), comprobamos al comparar los niveles de lactoferrina en los diferentes grados de severidad con el obtenido en los controles sanos, como existe una mayor cantidad de lactoferrina liberada en todos los subgrupos de asma en comparación con los sujetos sanos controles, y al mismo tiempo que las cifras de lactoferrina liberadas por los neutrófilos de pacientes alérgicos son mayores cuanto mayor es la gravedad del asma (*Figura 18*).

Figura 18: Comparando la lactoferrina liberada en los controles con los pacientes con asma en cualquiera de los estadios de severidad, comprobamos como en todos los casos existe una diferencia significativa, siendo siempre mayor la liberación en los pacientes con asma ($p = 0,012$; $p < 0,001$; $p < 0,001$). Además también se objetiva como a medida que la severidad del asma es mayor, la liberación de lactoferrina también aumenta con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,002$, $p < 0,001$; $p < 0,001$) entre los diversos grados de asma.

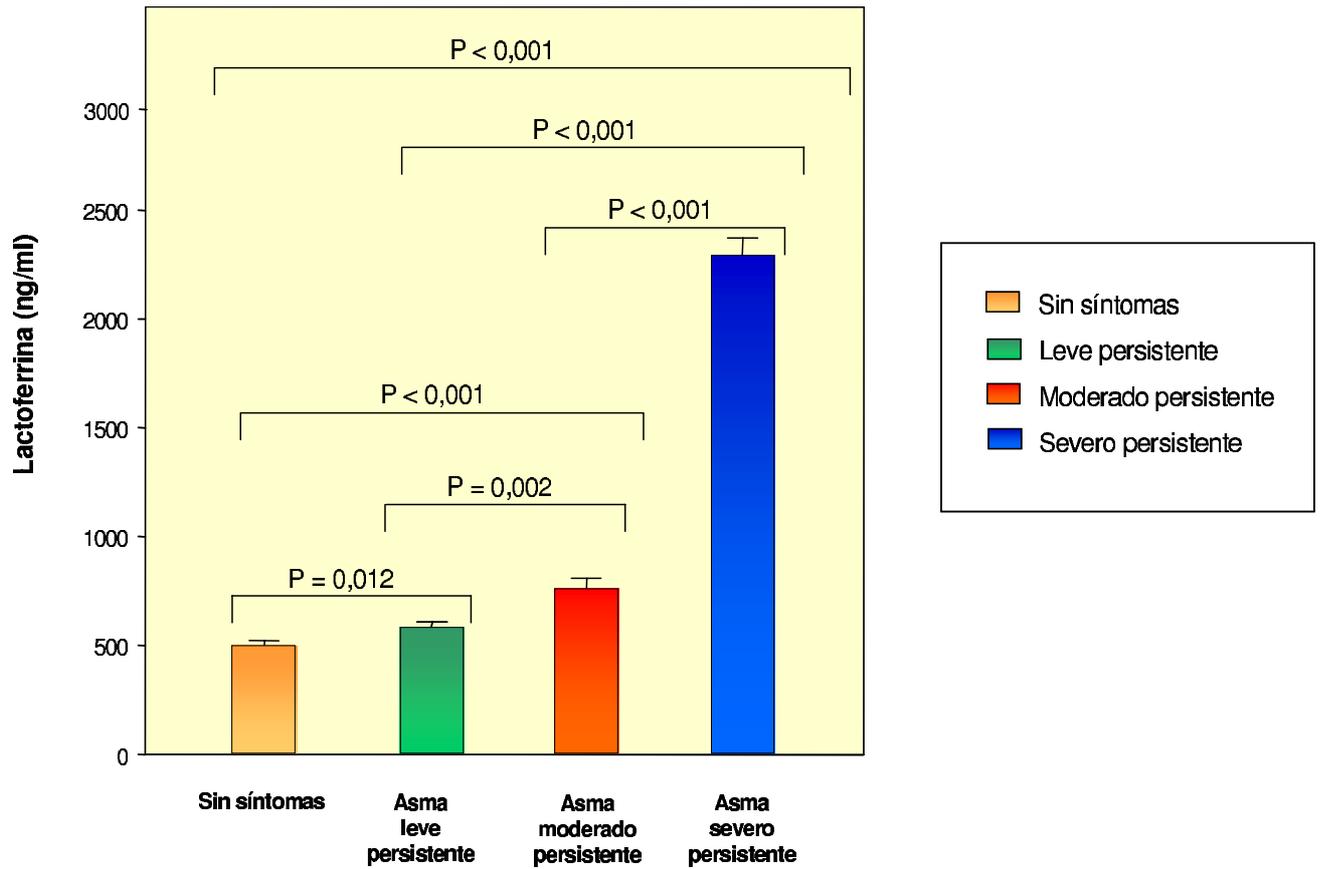


Figura 18: Comparación de la lactoferrina liberada según la gravedad del asma

DISCUSIÓN

5.1.- PARTICIPACIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS EN LOS PROCESOS ALÉRGICOS

Muchas células están implicadas en la fisiopatología de los procesos atópicos. Está bien probada la contribución de mastocitos, linfocitos y eosinófilos. Sin embargo, en una reciente revisión se indica como sólo el 50 % de los casos de asma están asociados con una inflamación eosinofílica y en la mayoría de los otros casos se encuentra en las vías aéreas un aumento de neutrófilos y de interleukina 8 (IL-8)³¹⁰.

Los neutrófilos son leucocitos polimorfonucleares, que juegan un papel esencial en el sistema inmune, siendo la primera línea de defensa contra las infecciones por bacterias y hongos. Inicialmente se pensó que su papel en la inflamación estaba restringida a su capacidad de fagocitosis y de liberación de enzimas y otros agentes citotóxicos. Sin embargo, en la actualidad se conoce como estas células pueden liberar diversos mediadores que pueden ejercer un profundo efecto en las vías aéreas de individuos asmáticos. Entre ellos se incluyen a proteasas, que puede destruir la matriz extracelular tales como las metaloproteinasas de la matriz (MMP) (por ejemplo: MMP-9, colagenasa y elastasa). Pueden liberar radicales tóxicos de oxígeno vía MPO que catalizan la producción de ácido hipocloroso (HOCl). Los neutrófilos son también fuente de citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleukina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8 y LTB₄.

En la actualidad, existen cada día más evidencias de la participación de los neutrófilos en los procesos alérgicos.

5.1.1.- Receptores de IgE en neutrófilos humanos

Un punto de vital importancia para demostrar que el neutrófilo puede tomar parte activa en la reacción alérgica, ha sido el descubrimiento de que estas células poseían las tres formas conocidas en la actualidad de receptores para la IgE: el heterotrimérico receptor de alta afinidad (Fc ϵ RI)^{18, 19}, el receptor de baja afinidad para la IgE (Fc ϵ RII/CD23)^{20,21} y el Mac-2/IgE-binding protein (ϵ BP)^{22, 23, 24}.

En algunos de estos trabajos no sólo se ha demostrado la presencia de estos receptores, sino que se ha comprobado que existen rasgos característicos en los pacientes alérgicos:

- El número de neutrófilos positivos para el Mac-2, fue similar en los pacientes atópicos que en los controles sanos²².

▪ Se ha descubierto como los neutrófilos poseen el mRNA de las tres cadenas de FcεIR: FcεIRα, FcεIRβ y FcεIRγ. La cadena FcεIRα no es constitutiva pero si es inducible, por lo que se ha podido comprobar como existen diferencias entre pacientes asmáticos y sujetos sanos. El porcentaje medio de neutrófilos de sangre periférica positivos para el FcεIRα, fue del 70% en enfermos asmáticos comparados con el 4% del grupo de controles sanos. Asimismo, se pudo comprobar como los neutrófilos de los lavados alveolares de los enfermos asmáticos también poseían FcεIRα. Por todo ello se ha especulado que las citoquinas de tipo Th2, como la IL-4 podrían modular positivamente en los neutrófilos de los enfermos asmáticos la presencia del FcεIR¹⁹.

▪ Yamaoka K.A. y Colbs²⁰ han demostrado como el Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF), es capaz de estimular la síntesis y una mayor expresión del FcεRII/CD23 en neutrófilos humanos de donantes sanos, tras 18 horas de incubación. Vella A. y Colbs²¹, no han podido conseguir un aumento en la expresión del CD23 en neutrófilos de pacientes con artritis reumatoide tras estimular con GM-CSF, interferón-γ o interleukina 4. Curiosamente, lo mismo en los enfermos reumatoideos como en los atópicos, existe un aumento del FcεRII/CD23 en los neutrófilos incubados solo en el medio de cultivo sin la adición de ningún factor estimulador con respecto a los controles sanos. Posiblemente, la estimulación natural *in vivo* de los neutrófilos de los pacientes con GM-CSF, pudiera hacerlos no reactivos a una posterior estimulación “*in vitro*” con el mismo factor.

La presencia de moléculas de IgE, se ha demostrado en la superficie de neutrófilos, no sólo de pacientes alérgicos, sino también de sujetos²². Esto significa que si estas células poseen receptores de IgE y moléculas de IgE en su superficie, cabe la posibilidad de que pudieran estimularse por un mecanismo dependiente de esta inmunoglobulina, elemento clave de las reacciones alérgicas. Efectivamente, nuestro grupo demostró como podían activarse por este mecanismo e incluso se pudo comprobar, por citometría de flujo y por microscopía de fluorescencia, como los alérgenos se unían a la superficie de los neutrófilos de una forma específica.

5.1.2.-Exocitosis de los gránulos del neutrófilo

La exocitosis juega un papel muy importante en la fisiología del neutrófilo tal y como ya hemos comentado anteriormente. La secreción de los distintos gránulos parece regular las respuestas tempranas de estas células, como la adhesión, extravasación de las

mismas, así como el inicio del estallido respiratorio. Como hemos indicado en la Introducción, los neutrófilos poseen varios gránulos: los azurófilos o gránulos primarios, definidos por su contenido en mieloperoxidasa y elastasa; los secundarios o específicos, ricos en lactoferrina; los terciarios, ricos en gelatinasa y otros orgánulos denominados vesículas secretorias con predominio de fosfatasa alcalina. Los gránulos azurófilos contienen un gran número de enzimas líticas que pueden lesionar el tejido adyacente si se liberan por un mecanismo fuera de control. Los específicos y terciarios constituyen un reservorio de proteínas de la membrana plasmática celular, que se traslocan a la superficie de la misma después de la activación celular. Al mismo tiempo, contienen una amplia gama de proteínas envueltas en la adhesión y extravasación de los neutrófilos humanos, así como enzimas implicados en la generación de mediadores solubles de la inflamación.

Los diferentes gránulos poseen funciones fisiológicas distintas, por lo que la exocitosis de los mismos se regula por mecanismos independientes, tanto que la degranulación de los azurófilos puede realizarse sin que se efectúe la de los secundarios y viceversa. Por ejemplo, si opsonizamos a la *Salmonella typhimurium* con IgG y el factor del complemento C3_b y la exponemos a la acción de los neutrófilos, se detectan en el medio tanto defensinas como lactoferrina (marcadores de la degranulación de los gránulos azurófilos y específicos respectivamente). Pero si esas bacterias se opsonizan solamente con C3_b, entonces no aparece la lactoferrina, señal de que no ha habido degranulación de los gránulos secundarios.

Nuestro grupo ha demostrado como los gránulos primarios se liberan mediante un mecanismo dependiente de la IgE. Puesto que los gránulos secundarios juegan también un papel trascendental en la respuesta del neutrófilo, y dado que una de las sustancias contenidas en los mismos es la lactoferrina, hemos querido comprobar mediante el estudio de la misma si efectivamente se podía realizar también una exocitosis de estos gránulos secundarios o específicos por un mecanismo IgE mediado.

5.2.- CARACTERÍSTICAS DE LA SECRECIÓN DE LACTOFERRINA

Efectivamente, hemos logrado comprobar que si estimulamos a los neutrófilos con alérgenos liberan al medio lactoferrina. Esta liberación es dependiente del tiempo de incubación a la que sometemos a estas células y de la cantidad de alérgeno que ponemos como estímulo.

5.2.1- Estudio de la cinética: dosis y tiempo en la liberación de lactoferrina

1. Tras realizar una cinética para conocer el tiempo idóneos de estimulación de los neutrófilos para conseguir la máxima liberación de lactoferrina, llegamos a la conclusión de que el tiempo óptimo de estimulación era de 30 minutos. Este tiempo a resultado ser el más adecuado para lograr la liberación de ciertos mediadores tras estimular con alergenos a los neutrófilos de los pacientes atópicos. Así la liberación de elastasa y mieloperoxidasa también ocurre de modo óptimo en este tiempo, pero no siempre sucede así puesto que para la liberación de IL-8 y la ECP son necesarias 18 horas de incubación con el alergeno para dar su mejor rendimiento, tal y como hemos comprobado en otros de nuestros estudios ³¹¹⁻³¹³.

2. La cantidad de alergeno, al igual que el tiempo, necesario para que tenga lugar la óptima liberación del mediador, varía en los múltiples estudios realizados dependiendo de diversos factores tales como el alergeno utilizado, la célula manejada en el estudio ³¹⁴⁻³¹⁷ y por supuesto el mediador a estudiar. En términos generales y basándonos en estudios realizados anteriormente en células mononucleares en los que la cantidad de alergeno manejada fluctuaba en un rango relativamente amplio tomamos en principio como referencia un rango que oscilara alrededor de 10 µg/ml ³¹⁸, cantidad de alergeno que posteriormente ha demostrado ser la más apta para la estimulación de los neutrófilos de las analizadas tras los diversos ensayos practicados para producir la máxima liberación de lactoferrina.

Por tanto tras realizar estudios cinéticos de la dosis y tiempo idóneos de estimulación de los neutrófilos para obtener la máxima liberación de lactoferrina utilizamos como valores más adecuados para los ensayos realizados un tiempo de incubación de 30 minutos y la concentración de alergeno de 10 µg/ml.

5.2.2.- Liberación alergeno-específica

El siguiente paso que hemos dado es identificar si la exocitosis de lactoferrina que se produce cuando ponemos en contacto el alergeno con los neutrófilos es específica.

Hemos podido comprobar que sí es una reacción específica, puesto que sólo aquellos neutrófilos de pacientes sensibles al alergeno responsable del cuadro clínico son capaces de liberar lactoferrina. Para comprobar esta especificidad, tomamos los

neutrófilos de pacientes alérgicos y los estimulamos con alergenios a los cuales no eran sensibles. Y aún más, tomamos células de sujetos sanos y también los estimulamos con alergenios. En ningún de estos dos últimos casos se pudo demostrar liberación de lactoferrina al medio al realizar la estimulación con alergenios.

El PAF es un estimulador inespecífico de la liberación de lactoferrina, de manera que si estimulamos a los neutrófilos humanos con el mismo, siempre debe producirse la exocitosis de la misma. En el caso de los neutrófilos estimulados con alergenios a los cuales no eran sensibles y en neutrófilos de controles sanos, al no demostrarse liberación de lactoferrina, nos podíamos preguntar si la falta de liberación obedecería a una alteración intrínseca de las células en estos casos, especialmente en el de los atópicos. Para ello, estimulamos las células de ambos grupos con PAF y pudimos comprobar como sí liberaban lactoferrina.

Las endotoxinas son productos derivados de las bacterias y tienen la propiedad de activar de forma importante e inespecífica a los neutrófilos. Por ello, determinamos la cantidad de endotoxinas que contenían todos los productos que utilizábamos para nuestros experimentos, incluidos los alergenios. Pudimos comprobar que poseían cantidades ínfimas, del orden de ≤ 0.01 ng/ml, o sea, prácticamente no contenían endotoxinas. Pero a pesar de eso, se podía pensar que aun así podían activar inespecíficamente a los neutrófilos. Sin embargo, ello queda descartado cuando pudimos comprobar que al estimular con alergenios a los neutrófilos de pacientes que no presentaban cuadros clínicos debidos a ellos y cuando estimulábamos células de controles sanos, la cantidad de lactoferrina liberada era similar a la producida por las células cuando sólo se incubaban en el medio de cultivo, sin alergenios.

Para descartar que sólo se pudiera producir la liberación de lactoferrina con un alergenio, hemos testado varios de ellos, pudiendo comprobar que si el paciente es sensible al alergenio se produce liberación de lactoferrina al ser estimuladas por ellos.

Por tanto pudimos confirmar como la liberación de lactoferrina es específica y depende de la existencia de sensibilidad al alergenio testado. Esto está en consonancia con todos nuestros trabajos anteriores ³¹¹⁻³¹³, en los cuales todas las reacciones analizadas eran igualmente específicas.

En ciertas células como los eosinófilos, se producen algunas acciones inespecíficas de los alergenios no IgE mediadas, habiéndose comprobado que en ellos se puede producir liberación de la ECP o quimiotaxis tras estimulación con los mismos. Estas acciones se producen lo mismo en sujetos sanos que en pacientes no

sensibilizados a los alérgenos utilizados y parecen ser debidas a la propia acción química de los alérgenos y no a un mecanismo IgE dependiente ³¹⁹.

Por tanto, aunque demostrábamos que la liberación de lactoferrina por los neutrófilos era una reacción específica no establecíamos que era mediada por un mecanismo IgE dependiente, por lo que nuestro paso siguiente fue demostrar este mecanismo.

5.2.3.- Liberación IgE-dependiente de lactoferrina

En la superficie de los neutrófilos existen también receptores para la IgG, son también tres: el Fc γ R I, Fc γ R II y Fc γ R III. Estos receptores se descubrieron antes que los de la IgE, por lo que siempre se ha pensado que los mecanismos en los cuales participaba alguna inmunoglobulina era precisamente la IgG la responsable de ellos. Nosotros, mediante una incubación con un ácido a baja temperatura y en 5 minutos hemos eluido las inmunoglobulinas de la superficie celular. El sobrenadante de estos experimentos lo hemos sometido a un análisis para averiguar si existía IgE y/o IgG específica al alérgeno que se estaba testando. Hemos podido comprobar como sólo los neutrófilos que tenían en la superficie celular IgE específica positiva al alérgeno a testar presentaban liberación de lactoferrina tras estimulación con el mismo. Una vez eluida la IgE específica de la superficie celular los neutrófilos no reaccionaban con el alérgeno pero si lo hacían con el control positivo (PAF). En ningún caso se encontró IgG específica ni en el suero ni en sobrenadante proveniente de la elución de las inmunoglobulinas de la superficie de los neutrófilos. Evidentemente, los sujetos sanos de referencia no poseían ni IgE ni IgG específica ni en suero ni en el líquido de elución.

En este caso hemos demostrado, igual que en anteriores ocasiones, como la respuesta al alérgeno en los neutrófilos de los pacientes alérgicos, está directamente relacionado con un mecanismo IgE dependiente. En sangre periférica se ha demostrado este mecanismo de activación en linfocitos, monocitos y basófilos, mientras que no se ha demostrado en eosinófilos.

5.3.- PECULIARIDADES DIFERENCIALES CON LA ACTIVACIÓN IgE DEPENDIENTE DE OTRAS CÉLULAS QUE PARTICIPAN EN LOS PROCESOS ALÉRGICOS

▪ Linfocitos: Se ha visto como las células T Fc ϵ R+ juegan un papel importante en la regulación de la respuesta IgE antígeno específica ³²⁰ a través de la liberación de ciertas citoquinas ^{321, 322}.

▪ **Monocitos:** Múltiples evidencias indican que la activación IgE-dependiente de los fagocitos mononucleares juega un papel importante en la patogénesis de la inflamación tisular alérgica. La activación IgE dependiente por los receptores FcεRII de los macrófagos alveolares da lugar a la síntesis de chemokinas (IL-8, monocyte chemoattractant protein-1[MCP-1]), citoquinas proinflamatorias (TNF-α, IL-1, IL-6) y citoquinas antiinflamatorias (IL-1 receptor antagonist [IL-1ra], IL-10), sin embargo los macrófagos alveolares de pacientes con asma alérgicos promueven la inflamación de la vía aérea tras su activación por los receptores IgE a través de su efecto preferencial sobre las citoquinas proinflamatorias^{323, 324}. Algunos estudios sugieren que los macrófagos alveolares pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la hiperreactividad de las pequeñas vías aéreas a través de la liberación IgE-dependiente de tromboxano A2 lo cual potencia perniciosamente la movilidad parasimpática de la musculatura lisa bronquial³²⁵.

En los diversos estudios realizados se aclara como dicha activación IgE-dependiente promueve la liberación de múltiples mediadores por los monocitos/macrófagos, posiblemente a través del receptor FcεRII/CD23 y la vía de traducción L-arginina-dependiente³²⁶. Otros estudios apuntan como ligandos del CD23 inducen la activación del AMPc en monocitos humanos CD23+, permitiendo de esta manera la regulación de ciertas funciones en los mismos³²⁷.

Prevalece la opinión de que los receptores de baja afinidad por la IgE FcεRII/CD23 son los más relevantes de los receptores implicados en la activación de los monocitos/macrófagos, sin embargo hay estudios que cuestionan esto proponiendo que los alérgenos interactúan sobre los receptores FcεRI de los fagocitos mononucleares y que son estos los que tienen una influencia esencial en las reacciones alérgicas³²⁸. De igual manera existen estudios que aunque reconocen la fijación de IgE por los macrófagos y que estos están implicados en las respuestas IgE-dependiente, proponen que dichas acciones no están relacionadas con el antígeno CD23³²⁹.

▪ **Basófilos:** no solo es conocido que la liberación de histamina por los basófilos es IgE-dependiente, sino que además anticuerpos anti-IgE pueden controlar la secreción de histamina alérgeno-inducida³³⁰. Además en ciertos estudios se ha demostrado como la activación IgE-dependiente de los basófilos produce la liberación de LTC₄ y la expresión del marcador CD63 en su membrana y que la determinación de LTC₄ y el estudio de los basófilos CD63+ por citometría de flujo son test con una buena sensibilidad y especificidad y más eficientes que la determinación de la histamina

liberada en los casos de alergia alimentaria ³³¹. La movilización del calcio intracelular parece ser crucial como señal iniciadora en la activación IgE-mediada de los basófilos ³³².

▪ Eosinófilos: Al poco tiempo del descubrimiento de los eosinófilos su presencia se relacionó con el asma y los procesos alérgicos. En la actualidad, al eosinófilo se le reconoce como un granulocito con características proinflamatorias que participa en la protección contra las infecciones parasitarias y que es importante en las enfermedades alérgicas. Existen numerosos estudios que demuestran la asociación entre los eosinófilos y varias enfermedades parasitarias y alérgicas en el género humano.

Los pacientes asmáticos presentan un mayor número de eosinófilos activados en la sangre periférica que los controles sanos ³³³. En el asma alérgica se ha observado con bastante frecuencia una infiltración de linfocitos y eosinófilos en el epitelio y la lamina propia de las vías respiratorias, incluso en el asma moderada y en la estable, y se ha observado una correlación entre el número de eosinófilos que infiltran las vías respiratorias y la gravedad del asma ¹⁶⁴. La provocación bronquial con antígeno específico en enfermos alérgicos provoca un reclutamiento de eosinófilos en las vías respiratorias acompañado de una liberación de proteínas citotóxicas granulares y de un aumento de la permeabilidad vascular ^{334, 335}. A pesar de la fuerte asociación existente entre los eosinófilos, sus proteínas granulares citotóxicas y ciertos tipos de enfermedades humanas, los mecanismos responsables de la activación “*in vivo*” de los eosinófilos no están tan claros.

En los diferentes estudios realizados para aclarar el papel de la IgE en la activación de los eosinófilos en los procesos alérgicos, se ha demostrado como estas células pueden expresar en su superficie FcεRI, FcεRII y Mac-2/E-binding protein (εBP) o galectina 3. Como resultado de estos estudios, era razonable especular que la activación de los receptores de la IgE en los eosinófilos intervenía de modo trascendental en los procesos secretores de estas células en las enfermedades alérgicas. Pero al contrario de lo esperado, se desconoce aún el significado funcional de los receptores de la IgE en los eosinófilos en los pacientes alérgicos ¹⁹⁸.

La expresión de los receptores de la IgE en los eosinófilos humanos y las funciones dependientes de esta inmunoglobulina no se observan de un modo similar en todos los casos. Casi todos los estudios que demuestran la presencia de receptores de la IgE en los eosinófilos humanos utilizan células de pacientes con una eosinofilia acentuada, como la debida al síndrome hipereosinofílico y las enfermedades asociadas a

ciertos trastornos cutáneos y linfomas³³⁶⁻³³⁹. No existen pruebas que demuestren la expresión de receptores de la IgE en los eosinófilos de donantes sanos o de sujetos con una eosinofilia mediana o moderada debida a trastornos más comunes como los procesos alérgicos o las infestaciones por helmintos. Algunos estudios que buscaron receptores de la IgE en procesos alérgicos no detectaron FcεRII en los eosinófilos de la sangre periférica^{340, 341} y detectaron sólo expresiones mínimas de FcεRI en los eosinófilos que infiltraban el tejido bronquial en pacientes con asma³⁴¹ o en los eosinófilos de la sangre periférica de pacientes con procesos atópicos^{198, 340, 342-344}. En otro estudio más reciente, no se encontró FcεRII en sujetos normales ni en pacientes con asma bronquial alérgica, dermatitis atópica, síndromes hipereosinofílicos, síndrome de hiper IgE ni infestaciones por helmintos, pero sí en un paciente con un mieloma IgE pero en cantidades muy bajas; en los mismos grupos de pacientes sólo se detectó una expresión mínima de FcεIR en un paciente con asma³⁴⁵. Curiosamente, este trabajo no pudo detectar receptores FcεIR en procesos en los que otros autores los habían encontrado como los síndromes hipereosinofílicos, la dermatitis atópica o el síndrome de hiper IgE. Por otra parte, las cantidades encontradas de FcεIR en los eosinófilos de los pacientes atópicos en todos los trabajos mencionados son tan bajas que difícilmente se distinguen de los controles negativos. Más reveladores se han mostrado los estudios sobre las funciones mediadas por la IgE de los eosinófilos. Los eosinófilos de los sujetos sanos son incapaces de realizar acciones citotóxicas mediadas por la IgE, pero sí de realizarlas si se les activa con el factor activador de las plaquetas sin la presencia de receptores de la IgE³⁴⁶. Pero aún más, en los eosinófilos humanos no se ha observado ninguna función dependiente de un mecanismo IgE como puede ser por ejemplo la producción de superóxido y del leucotrieno C₄ o la liberación de EDN y ECP, mientras que por el contrario esos mismos eosinófilos mostraban una respuesta vigorosa a estímulos mediados por la IgG₁, y la IgG₃, a través del receptor FcγRII^{198, 199, 340, 347-350}. De hecho parece que tanto la IgG como citoquinas, tales como la IL-5, parecen ser más importantes en la activación eosinofílica, en el curso de las enfermedades alérgicas que la IgE¹⁹⁹.

Todas estas observaciones han llevado a algunos autores a la conclusión de que otro(s) factor(es) diferente(s) a la IgE y sus receptores pueden actuar como inductor(es) de la activación/liberación de mediadores de los eosinófilos en las enfermedades alérgicas¹⁹⁸.

Otros estudios sostienen la hipótesis de una liberación selectiva de las proteínas de los gránulos, y parece ser que intervienen como señales de transducción tres receptores Fc (Fc epsilon R, Fc alpha R, Fc gamma R) presentes en los eosinófilos humanos ¹⁹⁹.

Por otro lado hay autores que han estudiado como los alergenios activan el factor nuclear- kappaB que a su vez conduce a la producción de citoquinas GM-CSF, TNF- α , e IL-8 y especulan sobre la posibilidad de que estas citoquinas actúen de forma autocrina aumentando la supervivencia de los eosinófilos “*in vivo*” ³¹⁶.

También se ha comprobado como los granos de polen liberan mediadores lipídicos que reclutan y activan a los eosinófilos “*in vitro*”. Esto ha llevado a pensar que mecanismos similares pueden ser efectivos bajo condiciones de exposición natural, donde los mediadores lipídicos asociados al polen pueden jugar un papel importante en el reclutamiento de eosinófilos en los sitios de inflamación alérgica ³¹⁹.

5.4.- RELACIÓN ENTRE LA IgE SÉRICA Y LA SECRECIÓN DE LACTOFERRINA

Una vez demostrada que la liberación es IgE dependiente, queríamos afianzar nuestros hallazgos comprobando si la cantidad de IgE específica sérica se correspondía con la cantidad de lactoferrina liberada por los neutrófilos tras el estímulo alérgico. Hemos podido demostrar como existe una correlación positiva entre ambos parámetros. Esto refuerza el papel de la IgE en la liberación de lactoferrina. Nuestro grupo no había comprobado anteriormente esta correlación en los otros parámetros analizados. Pero a pesar de ello, esta correlación no es absoluta lo que indica que aunque la liberación de lactoferrina es un mecanismo dependiente de la cantidad de esta inmunoglobulina, pueden existir también otros factores que influyan en los niveles de lactoferrina secretada por los neutrófilos de los pacientes atópicos cuando se estimulan con el alérgico al que son sensibles (p. ej. factores genéticos, factores ambientales, la acción de ciertas citoquinas y/o mediadores...).

Con respecto a otras células se ha comprobado en ciertos casos como sí existe esta correlación, mientras que en otros no. Esta última circunstancia nos lleva a pensar que existen otros mecanismos, además de la cantidad de IgE específica, que determinan el montante total de la liberación de ciertos mediadores ^{351, 352}. Este es el caso de la histamina liberada por los basófilos, donde se ha visto que existe una relación entre la cantidad de IgE y la histamina liberada ^{353, 354}, pero que también existen otros estímulos

IgE independientes que por vías diferentes pueden influir en la liberación de este mediador ³³¹.

En los diferentes estudios realizados se ha podido comprobar la existencia de una correlación positiva entre los resultados de las diferentes pruebas diagnósticas: tests cutáneos, determinaciones de IgE específica y test de provocación, lo que concuerda con nuestros resultados ya que hemos evidenciado una correlación entre la cantidad de lactoferrina liberada por los neutrófilos tras el estímulo alérgico y el resultado de los tests diagnósticos como veremos más adelante ^{355, 356}, aunque es cierto que no en todos los artículos hay acuerdo sobre las ventajas que pueden aportar algunas de estas pruebas sobre las demás ³⁵⁷. Lo que si suelen afirmar la mayoría de los estudios es la falta de correlación entre la cifras de IgE total con el resto de pruebas diagnósticas ³⁵⁸.

Aunque no lo hemos recogido en el apartado de Resultados, la IgE específica eluida de la superficie celular, se correspondía de forma absoluta con la cantidad de la IgE específica del suero ($r = 1$).

5.5.- RELACIÓN ENTRE LA SECRECIÓN DE LACTOFERRINA Y LA CLÍNICA DE LOS PACIENTES ATÓPICOS

Como la mayoría de la investigación de nuestro grupo se ha realizado en pacientes asmáticos y se podía argumentar que quizás estos hallazgos sólo se lograban alcanzar con células procedentes de estos enfermos, nos surgió la duda de si los fenómenos que detectábamos en los neutrófilos obedecían al proceso asmático o bien al carácter atópico de los pacientes. Para aclararlo hemos realizado estos mismos experimentos en pacientes con asma bronquial y pacientes con rinitis extrínseca. Cuando estimulamos los neutrófilos en ambos grupos de pacientes con los alérgenos a los que eran sensibles, observamos como no había diferencias significativas en la lactoferrina secretada en ambos casos. Esto demostraba que nuestros experimentos desarrollados en los pacientes alérgicos eran consecuencia de su condición atópica y que no tenían nada que ver con el cuadro clínico. Por supuesto, todos los experimentos se llevaron a cabo en pacientes que no presentaban en ese momento ninguna sintomatología clínica.

Aunque estos experimentos no los ha realizado nuestro grupo con otros parámetros investigados en neutrófilos de pacientes alérgicos, son lógicos estos hallazgos si pensamos que otros elementos de diagnóstico como son los tests cutáneos o los tests de provocación son positivos a los alérgenos a los que son sensibles los pacientes independientemente de

la sintomatología que padezcan. Lo mismo pasa con las pruebas “*in vitro*”, como puede ser la IgE específica o el test de liberación de histamina.

5.6.- RELACIÓN ENTRE LA DEGRANULACIÓN DE NEUTRÓFILOS Y LAS PRUEBAS FUNCIONALES RESPIRATORIAS

A continuación hemos desarrollado diversas estrategias experimentales para determinar si la liberación de lactoferrina por los neutrófilos de pacientes alérgicos se relaciona de alguna forma con la función ventilatoria pulmonar, con el grado de respuesta bronquial a la provocación inespecífica (con metacolina) y específica (con alérgenos) y con la gravedad del asma.

5.6.1.- Relación con la función ventilatoria pulmonar

Hemos encontrado que existe una relación inversa entre la liberación de lactoferrina y el FEV₁ de los mismos pacientes. Esto significaría que la liberación de lactoferrina estaría relacionada con las pruebas funcionales respiratorias. Mientras peores resultados de la función respiratoria tenemos, más cantidad de secreción de lactoferrina se objetiva. Ello nos hace pensar que la lactoferrina puede intervenir en el deterioro de la función respiratoria de los enfermos asmáticos.

Existe un trabajo ⁷⁶ en el que no se encuentra variación del cociente lactoferrina/número de neutrófilos en sangre periférica en las determinaciones tomadas a las 4 PM, 8 PM, medianoche, 4 AM y 8 AM. Las 4 AM es la hora donde se produce mayor caída del Pico de Flujo y aunque se observa en ella una mayor cifra del cociente lactoferrina/número de neutrófilos, no es estadísticamente significativo. En este trabajo existe una clara diferencia con el nuestro ya que las determinaciones se hacen en sangre periférica total, por lo que el “efecto dilución” puede hacer que los hallazgos no sean relevantes. Nuestro estudio se hace en condiciones más cerradas por lo que se pueden detectar diferencias en el comportamiento de los neutrófilos difícilmente posibles de hacerlo cuando se analiza sus resultados en sangre periférica. Por otra parte, la metodología del trabajo es confusa pues parece ser que el estudio se hace con pacientes con un asma leve según indican incluso en el título del trabajo. Sin embargo, en el material y métodos entre los condicionantes de inclusión se encuentra el que los pacientes deberían tener un FEV₁<70% del previsto (lo que precisamente no se corresponde con la inclusión en el grupo de pacientes leves según las indicaciones del GINA), mientras que en otra parte del trabajo se indica que los pacientes estudiados

presentan una media del FEV₁ del 89.9% del previsto. Aunque en este trabajo se indica que se ha utilizado para la correlación de los parámetros el test de Sperman, parece que lo que se ha realizado es una comparación de la media \pm el error estándar de la media de los valores obtenidos en las diferentes franjas horarias por el test de la U de Mann-Whitney. Por una parte tendría que haberse aplicado un análisis de correlación entre las cifras del cociente lactoferrina/número de neutrófilos y los valores absolutos del Pico de Flujo y no una comparación entre los datos del cociente en las diversas tomas. Por otra parte no se puede comparar la media de las diversas tomas con un análisis mediante el test de la U de Mann-Whitney, la media es un dato estadístico que se emplea en las poblaciones que siguen una distribución normal gaussiana (se debería haber empleado la t de Student), y sin embargo la U de Mann-Whitney se utiliza para el análisis de poblaciones que no siguen una distribución normal (se deberían haber empleado la mediana y los percentiles 25% y 75%).

Que nosotros sepamos, no existe ningún tipo de estudio previo que investigue la producción de lactoferrina “*in vitro*” tras estímulo con alérgeno y su relación con las pruebas funcionales respiratorias. Otros mediadores procedentes de los gránulos azurófilos como la mieloperoxidasa y la elastasa liberada por los neutrófilos también se correlacionan inversamente de modo similar a la lactoferrina con los valores del FEV₁. Esto corroboraría el posible papel del neutrófilo en el deterioro de la función respiratoria en los pacientes con asma bronquial extrínseca. Nuestros hallazgos se correlacionan con otros estudios realizados por otros autores. En un estudio realizado mediante el análisis del esputo inducido, existe una correlación positiva entre el número de neutrófilos en esputo con la concentración de agua oxigenada presente en el aire expirado de los pacientes asmáticos³⁵⁹ y con la variabilidad del pico de flujo³⁶⁰ y una correlación negativa entre los valores del FEV₁ y el número de neutrófilos presentes en pacientes con asma bronquial³⁶¹.

5.6.2.- Relación con el grado de respuesta bronquial tras la provocación bronquial:

En los pacientes alérgicos, la provocación bronquial con un alérgeno induce una respuesta inmediata, que puede ser seguida en cierto número de pacientes de una respuesta tardía. Estas respuestas son un buen modelo para investigar los procesos inflamatorios en el asma.

En una proporción que se estima entre el 47 al 73% de los asmáticos se produce una respuesta tardía a las cuatro o seis horas, que alcanza su pico máximo entre las seis

y doce horas, desapareciendo a las veinticuatro horas. Esta respuesta tardía es más prolongada, se acompaña de una hiperinsuflación pulmonar severa y puede producirse en ausencia de reacción inmediata. Como hemos ya expuesto, es evidente que nuestros hallazgos son más relevantes en el caso de existir una reacción tardía. No es de extrañar, puesto que esta reacción está condicionada por la presencia de células efectoras secundarias como son los eosinófilos y los propios neutrófilos. En efecto la llamada inflamación alérgica se caracteriza por ser un fenómeno dual o bifásico que consta de una primera fase o respuesta inmediata consecutiva a la liberación de mediadores primarios a partir de las llamadas células efectoras primarias, representadas por los mastocitos y basófilos, seguida de una segunda fase retardada más prolongada caracterizada por la infiltración del foco inflamatorio por células efectoras secundarias entre las que destacan fundamentalmente los eosinófilos y los neutrófilos ³⁶² que van a liberar a su vez otros mediadores inflamatorios secundarios responsables de la respuesta tardía.

Una vez que estas células migratorias o efectoras secundarias de la inflamación, entre las que destacan los eosinófilos y los neutrófilos, alcanzan el foco inflamatorio, donde son reclutadas y activadas, comienzan a segregar una serie de mediadores secundarios proinflamatorios preformados tales como la proteína básica mayor (MBP) del eosinófilo, la ECP, la neurotoxina del eosinófilo (EDN), la peroxidasa del eosinófilo (EPO), mediadores lipídicos neoformados (PAF, LTC₄, prostaglandinas), citoquinas, factores de crecimiento como el GM-CSF que inhiben la apoptosis y prolongan la supervivencia de las células reclutadas y por último quimiocinas con capacidad atrayente celular tales como la eotaxina, MIP o proteína inflamatoria de macrófagos, RANTES, etc. En resumen, tenemos que decir que la respuesta alérgica tiene un carácter bifásico o dual con una fase inmediata caracterizada por la liberación de mediadores primarios, a partir de células efectoras primarias (mastocitos y basófilos), responsables de los síntomas de esta fase por actuación sobre los correspondientes órganos de choque y una fase tardía producida por la liberación de mediadores secundarios por parte de las células efectoras secundarias reclutadas a lo largo del proceso inflamatorio ³⁶³⁻³⁶⁵.

En algunos trabajos incluso se llega a afirmar que en aquellos pacientes que presentan una respuesta dual existe una mayor activación de mastocitos que en los pacientes que únicamente presenta una respuesta inmediata ³⁶⁵, lo cual parece concordar con los estudios de ventana cutánea tras provocación específica de la piel,

cuyos resultados sugieren una selectiva liberación IgE-mediada de ciertos componentes de los neutrófilos posiblemente relacionada con el grado de activación precoz de los mastocitos ya que existe cierta correlación entre las cantidades de lactoferrina liberada en torno a las 2-4 horas y la histamina liberada en la primera hora.

Hemos podido comprobar que tras la provocación bronquial con suero fisiológico y con metacolina no existen variaciones en la liberación de lactoferrina entre la determinación basal antes de la provocación y después de la misma. Por el contrario, sí existen diferencias significativas entre las determinaciones basales y las realizadas después de la provocación específica con el alérgeno, independientemente de si induce sólo una respuesta inmediata o si es dual (inmediata y tardía). Bien es cierto que cuando existe una reacción tardía las determinaciones posteriores a la provocación son estadísticamente más elevadas que si sólo se produce una reacción inmediata.

Es normal que si se realiza una provocación con suero fisiológico no se obtengan diferencias con los valores basales, salvo que el suero fisiológico estuviera contaminado con sustancias estimuladoras como las endotoxinas. En nuestro trabajo no influye esta circunstancia pues como se recordará hemos cuantificado la cantidad de endotoxina en todos los componentes que hemos empleado y estos contenían una cantidad despreciable de ≤ 0.01 ng/ml.

En el caso de la provocación bronquial con metacolina existen estudios con resultados contradictorios. Kraft M. y cols.³⁶⁷ no encuentran ninguna alteración de la celularidad (linfocitos, eosinófilos y neutrófilos) en los lavados broncoalveolares, ni en diversos marcadores celulares como pueden ser: proteína catiónica de los eosinófilos, proteína de los cristales de Charcot-Leyden, TXB₂, LTB₄, lisozima de los neutrófilos así como lactoferrina, tras provocación bronquial con metacolina. Tanto es así, que los autores recomiendan su uso para poder analizar el grado de hiperreactividad bronquial, antes de realizar una broncoscopia porque no altera ningún parámetro inflamatorio. Por otra parte White M.V.³⁶⁸ tras la provocación nasal con metacolina encuentra una mayor cantidad de lactoferrina liberada en el lavado nasal de pacientes atópicos que en sujetos sanos controles. Esto podría deberse a las diferencias que existen en el órgano de choque de uno y otro grupo de sujetos ya que podrían actuar otros factores como una mayor afluencia de neutrófilos en el atópico junto a la presencia de una celularidad inmunocompetente diferente que al estimularse inespecíficamente pudiera desencadenar esta diferencia en los resultados.

Con la provocación alérgica específica observamos como existe una cantidad mayor de lactoferrina liberada, estadísticamente significativa, entre los valores antes de la provocación y después de la provocación tanto si el paciente ha tenido sólo una respuesta inmediata como si la ha tenido dual, inmediata y tardía. Los pacientes que tuvieron una reacción dual tienen una mayor liberación de lactoferrina después de la provocación bronquial que aquellos que sólo la tuvieron inmediata.

Aunque la actividad quimiotáctica del suero aumenta a los 30 minutos de haber realizado la provocación bronquial³⁶⁹, no es hasta las 3 horas cuando se detecta el mayor aumento de neutrófilos en sangre periférica³⁷⁰. A las 4 horas de la provocación ya encontramos un aumento significativo de neutrófilos y de IL-8 en el lavado broncoalveolar de los pacientes asmáticos⁴⁷ y a las 6 horas en las biopsias⁵⁴. Pero en realidad, no sabemos si la presencia aumentada de neutrófilos en las biopsias bronquiales estaría de forma más temprana puesto que no se ha realizado ningún estudio al respecto. Nosotros hemos realizado la toma de la muestra sanguínea a las tres horas de haber realizado la prueba de provocación, porque aunque hay autores que cifran el mayor aumento del número de neutrófilos en sangre periférica a las 8 horas³⁷¹, los datos de Upham y Colbs³⁷⁰ están más en consonancia con los hallazgos obtenidos en el lavado broncoalveolar y en las biopsias de los enfermos asmáticos tras provocación bronquial.

No nos encontramos ningún estudio en la literatura que haya realizado una valoración de la lactoferrina tras el test de provocación bronquial. Nuestro grupo tampoco ha realizado hasta la fecha ninguna valoración de los diversos parámetros estudiados en los neutrófilos de pacientes asmáticos tras este tipo de intervención. Nos encontramos hallazgos similares si se realiza un test de provocación en la piel mediante el estudio de la ventana cutánea, habiéndose observado una mayor cantidad de lactoferrina en los pacientes alérgicos, cuando eran estimulados con el alérgeno al que eran sensibles que cuando se hacía la provocación con suero fisiológico; el incremento de la cantidad de lactoferrina encontrado tiene lugar a las 2-4 horas de la provocación con el antígeno a diferencia de la histamina que se eleva en la primera hora para posteriormente descender. Igualmente en estos estudio de ventana cutánea, con la finalidad de valorar los componentes liberados por el neutrófilo que pudieran jugar un papel en la patogénesis de las reacciones alérgicas, se ha comparado el modelo de liberación de diferentes mediadores, objetivándose como la elastasa presenta un modelo similar a la lactoferrina, mientras que no se objetivan cambios significativos en la

liberación de mieloperoxidasa y láctico deshidrogenasa entre los pacientes controles con respecto a los pacientes provocados con el antígeno específico. Esta elevación en la cifra de lactoferrina no sólo es un reflejo de una mayor concentración de neutrófilos en los puntos de la provocación, ya que el aumento de la lactoferrina no tiene una correlación significativa con el número de neutrófilos en los estudios de ventana cutánea, mientras que si guarda una correlación significativa con la concentración de histamina liberada en la respuesta inmediata en los lugares de la provocación antígeno-específica. Por tanto estos hallazgos sugieren una selectiva liberación IgE mediada de ciertos componentes de los neutrófilos en las reacciones alérgicas cutáneas, posiblemente relacionada con el grado de activación precoz de los mastocitos. Por ello se pensó que la lactoferrina jugaba un papel muy significativo en la fase tardía de las reacciones alérgicas ⁹⁷. De modo similar en otros estudios después de una provocación nasal antígeno-dependiente, se elevó de forma estadísticamente significativa la cantidad de lactoferrina en el lavado nasal, dependiendo de la dosis de alérgeno suministrada ³⁷².

Otros datos que refuerzan nuestros hallazgos son el recuento del número de neutrófilos:

- Se ha demostrado un aumento de neutrófilos en biopsias bronquiales a las 24 horas, en los sujetos asmáticos que fueron sometidos a una provocación inhalatoria alérgeno específica con una respuesta bronquial tardía, pero no en el BAL ³⁷³⁻³⁷⁷. Otros autores también demuestran el aumento de los neutrófilos en el BAL en pacientes con una respuesta tardía ^{45, 46}.

- Tras la provocación bronquial alérgeno específica existe un aumento del número de neutrófilos en sangre periférica ³⁷⁰, de la capacidad quimiotáctica del suero para los neutrófilos ^{378, 379} y del número de estas células en esputo inducido ³⁶⁹.

- En el caso del test de provocación bronquial segmentario alérgeno específico, que tiene el inconveniente de que hay que introducir al menos dos veces el broncoscopio por lo que dicha maniobra por si misma puede originar una neutrofilia lo mismo en sujetos sanos que en enfermos asmáticos ³⁸⁰⁻³⁸², existen trabajos en los que se observa como efectivamente existe un aumento de neutrófilos tras provocación con alérgeno en comparación con el control salino ^{44, 47, 54, 334, 383-387}, pero las células que se obtienen de los BAL presentan muestras de estar activadas, como se comprueba por la mayor expresión de moléculas de adhesión en su superficie celular ³³⁵ y lo mismo ocurre en las células obtenidas en las biopsias bronquiales post-provocación ⁵⁴.

Otros estudios que se correlaciona con nuestros hallazgos son los estudios practicados con la metaloproteinasa- 9 (MMP-9), tras la provocación bronquial alérgico específica, pues se observa un aumento significativo de la MMP-9 en pacientes asmáticos sensibles a esos alérgenos, mientras que no ocurre ningún cambio en sujetos sanos. La cantidad de MMP-9 después de la provocación se correlaciona significativamente con los cambios en el FEV1 y con los porcentajes de neutrófilos ³⁸⁸. Hay que señalar que los neutrófilos son las células que aportan la MMP-9 ³⁸⁹.

5.6.3.- Relación con la gravedad del asma:

Con respecto a la severidad del asma, podemos comprobar como existe mayor cantidad de lactoferrina liberada en todos los subgrupos de asma en comparación con los sujetos sanos controles. Pero al mismo tiempo, se puede comprobar como mientras los pacientes tienen un grado más grave y persistente de su asma las cifras de lactoferrina liberada son mayores.

No hay estudios comparables en la literatura. Tampoco nuestro grupo ha realizado estudios comparativos de los otros marcadores de los neutrófilos en relación con la severidad del asma. No obstante, existen algunos estudios con unos resultados que en cierta medida están en consonancia con los nuestros. Así, en algunos de ellos se han encontrado unos niveles de lactoferrina en esputo inducido y en lavados broncoalveolares fueron superiores en los pacientes con asma estable que en los sujetos controles ^{390, 391}. Igualmente se ha encontrado un aumento estadísticamente significativo de lactoferrina en los bronquios de pacientes muertos por asma bronquial, que en los bronquios de pacientes muertos por otras causas no respiratorias ³⁹².

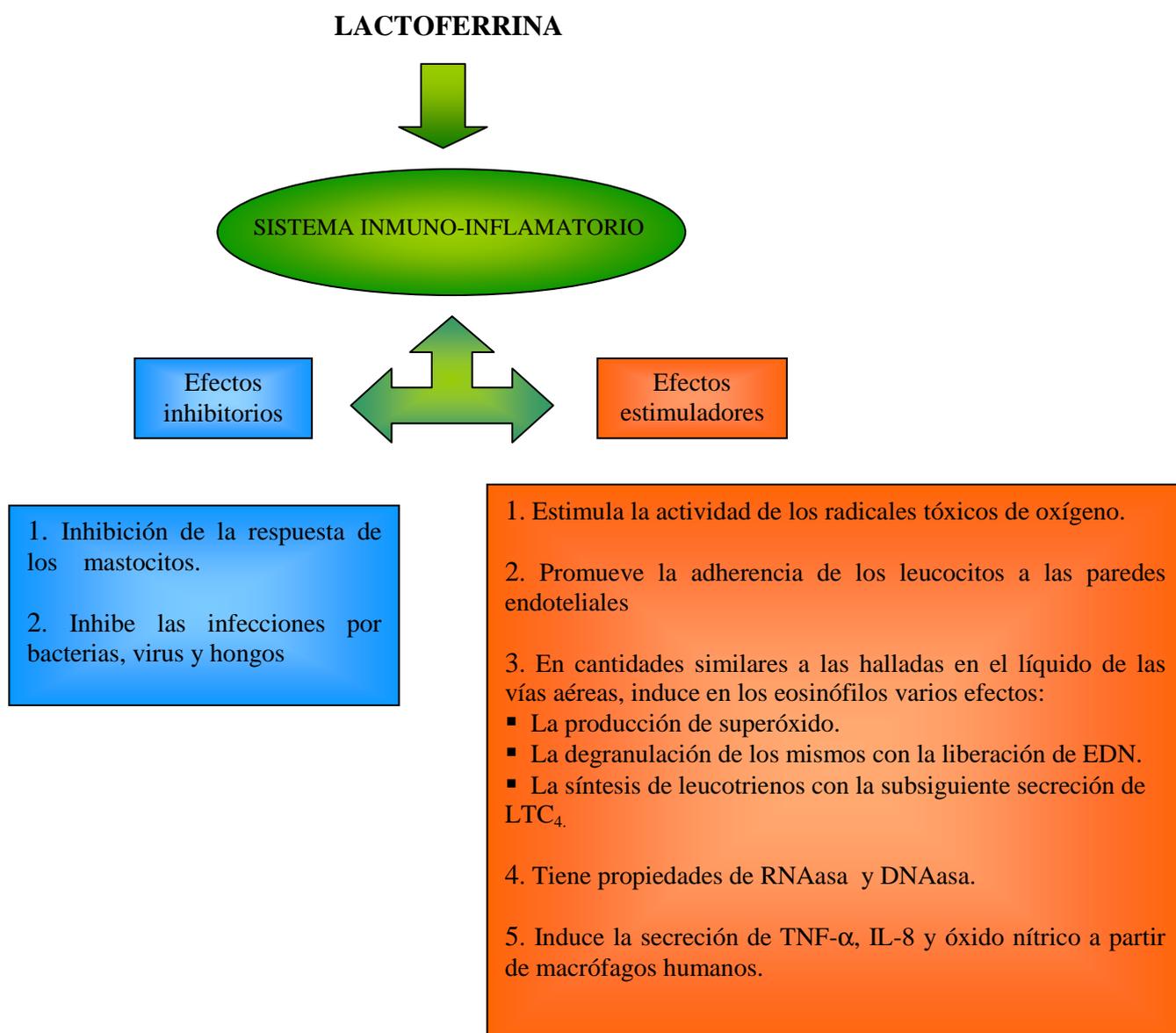
Lo que si existen son estudios con cuantificación del número de neutrófilos, mieloperoxidasa e IL-8 en esputo inducido o en biopsias de enfermos asmáticos relacionados con la severidad de su cuadro clínico, teniendo como referencia la misma clasificación que hemos realizado nosotros. Los diferentes mediadores están más elevados en los pacientes asmáticos en general con respecto a los sujetos sanos de referencia. Las diferencias se hacen más evidentes a medida que aumenta la gravedad y persistencia del cuadro. Estos hallazgos están en consonancia con nuestros resultados, quedando demostrado una mayor actividad de los neutrófilos en los cuadros de evolución más tórpida de asma bronquial ^{43, 359, 360, 393, 394}.

Sintetizando podríamos decir finalmente que en nuestro estudio hemos hallado una buena correlación entre la cantidad de liberación de lactoferrina con las pruebas

funcionales respiratorias, con la provocación bronquial antígeno específica y con el grado de severidad del cuadro asmático lo que refuerza nuestra hipótesis de trabajo.

5.7.- CONSECUENCIAS FISIOPATOLÓGICAS DE LA SECRECIÓN DE LACTOFERRINA

¿Qué significan estos hallazgos?. Analizaremos cuales pueden ser las consecuencias fisiopatológicas de una secreción alérgica específica de lactoferrina en los enfermos alérgicos en general y en los asmáticos en particular. Vamos a dividir pues los efectos de la lactoferrina en dos grupos: unos facilitadores de la respuesta inmuno-inflamatoria y otros inhibidores de la respuesta inmuno-inflamatoria.



1) Efectos inhibitorios de la respuesta inmuno-inflamatoria:

a) Inhibición de la respuesta de los mastocitos. Los mastocitos juegan un papel de gran importancia en la reacción inflamatoria, su activación provoca la degranulación con liberación de histamina que causa un aumento local del flujo sanguíneo y de la permeabilidad vascular, favoreciendo la posterior afluencia de células. Por tanto, los mastocitos forman parte de la primera línea de defensa contra agentes patógenos. Entre las proteasas liberadas se encuentran la triptasa y quimasa, estas proteasas tienen importancia clínica ya que la triptasa puede provocar hiperrreactividad bronquial, es un importante factor de crecimiento de los fibroblastos, lo que puede ser el motivo de la asociación existente entre la activación de los mastocitos y la fibrosis, y además pueden degradar al péptido intestinal vasoactivo (inductor de la relajación de la musculatura bronquial) al igual que la quimasa, que estimula la secreción bronquial. Por su parte, la catepsina G interviene al igual que la quimasa y triptasa en la remodelación de la matriz del tejido conectivo, ha demostrado ser un eficiente mediador en las interacciones neutrófilos-plaquetas y estimula la secreción de moco de las vías aéreas.

TRIPTASA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hiperreactividad bronquial ▪ Factor de crecimiento de fibroblastos ▪ Degradación del VIP ▪ Remodelación de la matriz del tejido conectivo.
QUIMASA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Estimula la secreción bronquial ▪ Degradación del VIP ▪ Remodelación de la matriz del tejido conectivo.
CATEPSINA G	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mediador en la interacción de neutrófilos-plaquetas. ▪ Estimula la secreción en las vías aéreas. ▪ Remodelación de la matriz del tejido conectivo.

La lactoferrina es capaz de inhibir la liberación de histamina y la actividad de la triptasa, quimasa y catepsina G de los mastocitos estimulados por un mecanismo IgE-dependiente³⁰⁴⁻³⁰⁸. La inhibición de la triptasa se lleva a cabo inhibiendo el efecto favorecedor que ejerce la heparina sobre la triptasa³⁹⁵, considerándose en diversos estudios que una de las funciones fisiológicas importantes de la lactoferrina de los neutrófilos podría ser la inhibición de la

triptasa liberada por los mastocitos y por tanto el papel que la misma ejerce en la broncoconstricción tardía e hiperreactividad bronquial ³⁰⁵.

- b) Se reconoce hoy, que en el asma extrínseca uno de los factores que empeoran el cuadro y que pueden originar agudizaciones, son las diferentes infecciones por bacterias y virus ³⁹⁶⁻⁴⁰⁰. La lactoferrina modularía esta respuesta inhibiendo las infecciones por bacterias, virus y hongos ⁴⁰¹⁻⁴⁰⁷. La lactoferrina se conoce por tener un espectro ancho de actividades microbiostáticas. El papel mejor conocido de la lactoferrina en el mecanismo de defensa es su comportamiento como un agente bacteriostático capaz de inhibir la proliferación de bacterias a través de sus propiedades captadora de hierro, pero también se sabe que la lactoferrina, además de su acción bacteriostática, puede tener también acción bactericida. El efecto bactericida de la lactoferrina obedece a fenómenos de permeabilización, es decir a su capacidad de dañar la membrana bacteriana con la alteración subsiguiente de su permeabilidad. Parece ser que la lactoferrina también muestra efectos fungicidas y antivirales.

2) Efectos estimuladores sobre el sistema inmuno-inflamatorio:

- a) Estimulación de la actividad de los radicales tóxicos de oxígeno. La lactoferrina tiene la habilidad de unirse a los iones férricos libres haciendo que estos no contribuyan a la catálisis de los radicales tóxicos de oxígeno por lo que podrán seguir ejerciendo sus funciones ²⁹⁹.
- b) Al mismo tiempo, la lactoferrina es capaz de promover la adherencia de los leucocitos a las paredes endoteliales, por lo que amplifica la respuesta celular inflamatoria ²⁹⁹.
- c) La lactoferrina neutrofílica, en cantidades similares a las halladas en el líquido de las vías aéreas ³⁰⁰, induce en los eosinófilos varios efectos: la producción de superóxido, la degranulación de los mismos con la liberación de EDN y la síntesis de leucotrienos con la subsiguiente liberación de LTC₄ ³⁰¹.
- d) Es bien sabido como la proteína catiónica de los eosinófilos ejerce parte de su acción citotóxica por tener característica de RNasa. Pues bien la lactoferrina tiene propiedades de RNasa y DNasa, por lo que puede ejercer acciones de citotoxicidad sobre el tejido circundante, y al actuar a nivel del árbol bronquial del asmático aumentar la gravedad y perpetuación del cuadro ³⁰².

- e) Los neutrófilos son capaces de convertirse en células fagocíticas tras influencia de varias citoquinas como GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , IL-4 y M-CSF⁴⁰⁸. Pues bien, la lactoferrina es capaz de inducir la secreción de TNF- α , IL-8 y NO a partir de macrófagos humanos³⁰³. Por otra parte, la lactoferrina también induce la liberación de IL-8 por los neutrófilos humanos⁴⁰⁹.

En definitiva la lactoferrina puede ser capaz de inducir la liberación de una serie de interleukinas celulares favoreciendo diferentes factores del proceso inflamatorio.

CONCLUSIONES

1. La provocación “*in vitro*” de neutrófilos de pacientes alérgicos con el antígeno responsable del cuadro clínico, conduce a un aumento en la liberación de lactoferrina. Esta liberación es específica, dosis-dependiente y tiempo-dependiente.
2. La IgE específica de la superficie celular del neutrófilo es responsable de la liberación de la lactoferrina a través de un mecanismo IgE-dependiente, descartándose la participación de la IgG.
3. La IgE específica sérica tiene una correlación positiva con la cantidad de lactoferrina liberada por los neutrófilos tras el estímulo alérgico específico. Esto refuerza el papel de la IgE en la liberación de lactoferrina.
4. Cuando estimulamos los neutrófilos de ambos grupos de pacientes (rinitis/asma) con los alérgenos a los que son sensibles, observamos como no hay diferencias significativas en la lactoferrina secretada en ambos casos. Esto demuestra que los resultados de este estudio desarrollado en los pacientes alérgicos son consecuencia de su carácter atópico e independientes del cuadro clínico que padece el paciente (rinitis/asma).
5. La liberación de lactoferrina está relacionada con las pruebas funcionales respiratorias, encontrándose una correlación inversa entre la liberación de lactoferrina y el FEV₁ de los mismos pacientes.
6. Tras la provocación bronquial con suero fisiológico y con metacolina no existen variaciones en la liberación de lactoferrina entre la determinación basal antes de la provocación y después de la misma. Por el contrario, al realizar la provocación específica con alérgenos observamos como existe una cantidad mayor de liberación de lactoferrina, estadísticamente significativa, entre los valores anteriores a la provocación y posteriores a la misma, tanto si el paciente ha tenido sólo una respuesta inmediata como si la ha tenido dual, inmediata y tardía. Bien es cierto que cuando existe una reacción tardía las determinaciones posteriores a la provocación son significativamente más elevadas que si sólo se obtiene una reacción inmediata.

7. Tomando como referencia para la valoración de la gravedad del asma, los cuadros establecidos en el GINA, se comprueba como existe una mayor cantidad de lactoferrina liberada en todos los subgrupos de asma en comparación con los sujetos sanos controles. Y al mismo tiempo, las cifras de lactoferrina liberadas por los neutrófilos de pacientes alérgicos son mayores cuanto mayor es la gravedad del asma.

RESUMEN

En la actualidad, cada día existen más evidencias de la participación de los neutrófilos en los procesos alérgicos en general y en el asma en particular.

Los neutrófilos son leucocitos polimorfonucleares, que juegan un papel esencial en el sistema inmune, siendo la primera línea de defensa contra las infecciones por bacterias. Su papel en la inflamación se pensó que estaba restringido a su capacidad de fagocitosis y de liberación de enzimas y otros agentes citotóxicos. Sin embargo, actualmente se conoce como estas células pueden liberar diversos mediadores que pueden ejercer un profundo efecto nocivo en las vías aéreas de individuos asmáticos. Estudios anteriores han demostrado que ante una provocación con un alérgeno específico, los neutrófilos llegan antes que los eosinófilos a los órganos diana. Los neutrófilos poseen los tres receptores de IgE en la superficie celular. Y además nuestro grupo ha demostrado, en numerosos trabajos, como alérgenos específicos pueden activar funcionalmente los neutrófilos de pacientes alérgicos sensibilizados a estos y liberar mediadores tras un estímulo IgE dependiente.

La lactoferrina es una proteína transportadora de hierro, que se encuentra presente en las granulaciones específicas o secundarias de los neutrófilos y que se revela cada vez más como una pieza fundamental en los acontecimientos fisiopatológicos ligados a la infección e inflamación. Participa en los mecanismos antibacterianos de los polimorfonucleares y se comporta como un importante regulador de la mielopoyesis y del metabolismo del hierro. La lactoferrina juega un papel central en la modulación del proceso inflamatorio de las vías aéreas, su habilidad para unirse a los iones férricos libres hace que estos no contribuyan a la catálisis de los radicales tóxicos de oxígeno por lo que podrán seguir ejerciendo sus funciones. Al mismo tiempo, la lactoferrina es capaz de promover la adherencia de los leucocitos a las paredes endoteliales, por lo que amplifica la respuesta celular inflamatoria. Interviene en la activación de las células Natural killer y promueve la activación de los macrófagos favoreciendo la secreción de TNF- α , IL-8, NO, IL-1 β , GM-CSF. La lactoferrina neutrofílica, en cantidades similares a las halladas en el líquido de las vías aéreas, induce en los eosinófilos varios efectos: la producción de superóxido, la degranulación de los mismos con la liberación de EDN, y la síntesis de leucotrienos con la subsiguiente secreción de leucotrieno C4, lo que sugiere que la adhesión de la lactoferrina al epitelio puede constituir un mecanismo iniciador del proceso inflamatorio eosinofílico dentro de las vías aéreas. Por tanto es posible que otros factores diferentes a la IgE (e.j lactoferrina liberada por los neutrófilos y sus receptores), actúen también como inductores de la activación de los

eosinófilos en los procesos atópicos IgE-mediados. Además, los hallazgos de que ECP secretada por los neutrófilos estimula la liberación de la lactoferrina por las glándulas serosas de la mucosa del árbol respiratorio, aumenta la posibilidad de que la activación del eosinófilo por esta lactoferrina pueda tener lugar a través de un mecanismo feedback positivo generado por la propia ECP del eosinófilo con la consiguiente activación persistente de esta célula dentro de la vía aérea. Por lo tanto es posible que la activación del neutrófilo mediada por la IgE pueda modular la respuesta de los eosinófilos en los procesos atópicos.

Los diferentes gránulos poseen funciones fisiológicas distintas, por lo que la exocitosis de los mismos se regula por mecanismos independientes, tanto que la degranulación de los azurófilos puede realizarse sin que se efectúe la de los secundarios y viceversa. Pues bien, nuestro grupo ha demostrado como los gránulos específicos se liberan mediante un mecanismo IgE-dependiente. Ante el incremento de la presencia de lactoferrina en procesos alérgicos, hemos querido comprobar que efectivamente se podía realizar también una exocitosis de los gránulos secundarios o específicos y en concreto de la liberación de lactoferrina, por un mecanismo antígeno-específico IgE-mediado.

Los neutrófilos de los pacientes asmáticos fueron estimulados con el alérgeno al cual eran específicamente sensibles midiéndose la liberación de lactoferrina en el sobrenadante celular. El tratamiento de los neutrófilos con el alérgeno provocó la liberación de la lactoferrina por los neutrófilos de pacientes que eran específicamente alérgicos a dicho alérgeno, demostrándose como la liberación de lactoferrina es bastante superior en las células de los pacientes asmáticos incubadas con el alérgeno al que son sensibles al compararla con la lactoferrina liberada por los neutrófilos de los controles sanos y los neutrófilos de los asmáticos estimulados con un alérgeno al que no están sensibilizados. Por tanto podemos concluir que la liberación de lactoferrina sí es una reacción específica y depende de la existencia de sensibilidad al alérgeno testado, y además que dicha liberación era a su vez dosis y tiempo-dependiente.

También hemos demostrado como los neutrófilos de los pacientes con test cutáneos e IgE específica positiva al alérgeno estudiado tenían en la superficie celular del neutrófilo IgE específica positiva al alérgeno, y que tras la incubación con el mismo, solo en estos neutrófilos se demostró la liberación de lactoferrina, deduciéndose que parece ser la IgE específica de la superficie celular del neutrófilo la responsable de la liberación de la lactoferrina a través de un mecanismo IgE-dependiente. En ningún caso se encontró IgG

específica ni en el suero ni en sobrenadante proveniente de la elución de las inmunoglobulinas de la superficie de los neutrófilos, por lo que descartamos la participación de la IgG. Además la IgE específica eluida de la superficie celular se corresponde de forma absoluta con la cantidad de IgE específica del suero. Por otro lado a medida que las cifras de IgE específica sérica aumentan también lo hace la cantidad de lactoferrina liberada por los neutrófilos tras el estímulo alérgico específico, lo que refuerza aún más el papel de la IgE en la liberación de lactoferrina. Pero a pesar de ello, no obtenemos una correlación total entre la cantidad de lactoferrina liberada y la cantidad de IgE específica sérica, lo que hablaría de que aunque es un mecanismo dependiente de la cantidad de esta inmunoglobulina, pueden existir también otros factores que influyan en la liberación de lactoferrina por los neutrófilos de los pacientes atópicos.

Como todos los estudios realizados hasta el momento habían sido realizados en pacientes alérgicos asmáticos se podía pensar que quizás estos hallazgos sólo se lograban alcanzar con células procedentes de este tipo de enfermos, lo que podría conducirnos a pensar que los mismos no obedecen al carácter atópico de los pacientes, sino a su condición de asmáticos. Para comprobar este extremo hemos estudiado la liberación de lactoferrina por los neutrófilos estimulados con el alérgeno al que son sensibles tanto en pacientes con asma bronquial como en pacientes con rinitis extrínseca. Cuando estimulamos los neutrófilos en ambos grupos de pacientes, observamos como no había diferencias significativas en la lactoferrina secretada en ambos casos. Esto demuestra que nuestros hallazgos son consecuencia del carácter atópico de los pacientes e independiente del cuadro clínico (rinitis/asma).

Para descartar que sólo se pudiera producir la liberación de lactoferrina tras la estimulación de los neutrófilos con un único alérgeno, decidimos estudiar la lactoferrina secretada tras la estimulación de los neutrófilos con diferentes alérgenos a los cuales los pacientes eran sensibles. De esta manera pudimos comprobar como la secreción de lactoferrina no se produce específicamente con un solo alérgeno sino tras la estimulación de los neutrófilos con cualquiera de los alérgenos a los cuales el paciente sea alérgico.

Posteriormente con la finalidad de aclarar si la liberación de lactoferrina por los neutrófilos de pacientes alérgicos se relaciona de alguna forma con la función respiratoria de los asmáticos, y por lo tanto aclarar a su vez el papel de los productos secretados por el neutrófilo sobre la función respiratoria, estudiamos la correlación entre la cantidad de lactoferrina liberada después de la incubación de dichos neutrófilos con los alérgenos y

la función pulmonar de los pacientes, midiendo el FEV₁, y encontramos que existe una relación inversa entre la liberación de lactoferrina y el FEV₁. Esto corrobora el posible papel del neutrófilo en el deterioro de la función respiratoria en los pacientes con asma bronquial extrínseca.

Hemos podido comprobar mediante la provocación bronquial con suero fisiológico y con metacolina que no se observan variaciones en la cuantía de lactoferrina liberada entre la determinación basal y la realizada tras la provocación. Al realizar la provocación específica con alergen observamos como existe una cantidad mayor de liberación de lactoferrina después de la provocación, tanto si el paciente ha tenido sólo una respuesta inmediata como si la ha tenido dual, inmediata y tardía. Y cuando existe una reacción tardía las determinaciones posteriores a la provocación son más elevadas que si sólo se obtiene una reacción inmediata. No es de extrañar, puesto que esta reacción está condicionada por la presencia de células efectoras secundarias como son los eosinófilos y los propios neutrófilos.

También hemos comprobado como al comparar los niveles de lactoferrina en los diferentes grados de severidad del asma y en los controles sanos, existe una mayor cantidad de lactoferrina liberada en todos los subgrupos de asma en comparación con los sujetos sanos controles, al mismo tiempo que las cifras de lactoferrina liberadas por los neutrófilos de los pacientes son mayores, cuanto mayor sea la gravedad del asma.

BIBLIOGRAFÍA

1. Monteseirín J, Camacho MJ, Gutierrez D, Llamas E, Guardia P, Bonilla I, Sanchez-Monteseirín H, Conde J. Neutrophils and allergy. *Allergol Immunopathol* 1996; 24: 193-200.
2. Conde J, Camacho M.J, Monteseirín J, Sobrino F. Papel del neutrófilo en la inflamación alérgica. Libro de Ponencias y Comunicaciones de la XXV Reunión de la Sociedad Andaluza de Alergología e Inmunología Clínica, 1996; 107-128.
3. Wright DG, Bralone DA, Gallin JI. The differential mobilization of human neutrophil granules. *Am J Pathol* 1997; 87: 273-279.
4. Sengelov HL, Kjeldsen L, Borregaard N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol* 1993; 150: 1.535-1.543.
5. Kjeldsen L, Bjerrum OW, Askaa J, Borregaard N. Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, containing granules. *Biochem J* 1992; 287: 603-610.
6. Lew DP, Monod A, Waldogel FA, Bewald B, Bagglioni M, Pozzan T. Quantitative analysis of the cytosolic free calcium dependency of exocytosis from three subcellular compartments in intact human neutrophils. *J Cell Biol* 1986; 102: 2.197-2.204.
7. Kjeldsen L, Bainton DF, Sengelov H, Borregaard N. Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granules subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. *Blood* 1993; 82: 3183-3191.
8. Borregaard N, Miller L, Springer TA. Chemoattractant-regulated mobilization of a novel intracellular compartment in human neutrophils. *Science* 1987; 237: 1.204-1.206.
9. Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond TA, Springer TA, Borregaard N. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 ($\alpha_n \beta_2$) in human neutrophils. *J Clin Invest* 1993; 92: 1.467-1.476.
10. Sengelov H, Boulay F, Kjeldsen L, Borregaard N. Subcellular localization of the receptor for N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Biochem J* 1994; 299: 473-479.
11. Calafat J, Knijpers TW, Jansen H, Borregaard N, Verhoeven AJ, Roos D. Evidence for small intracellular vesicles in human phagocytes containing cytochrome b₅₅₈ and the adhesion molecule CD11b/CD18. *Blood* 1993; 81: 3.122-3.129.
12. Sengelov H, Kjeldsen L, Kroeze W, Berger M, Borregaard N. Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophil. *J Immunol* 1994; 153: 804-810.

13. Borregaard N, Kjeldsen L, Ruygaard K, Bastholm L, Nielsen MH, Sengelov H, Bjerrum OW, Johnsen AH. Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils. *J Clin Invest* 1992; 90: 86-96.
14. Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, Sengelov H, Bastholm L, Nielsen MH, Baiton DF. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol* 1993; 51: 187-198.
15. Kjeldsen L, Sengelov H, Lollike K, Nielsen MH, Borregaard N. Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. *Blood* 1994; 83: 1.640-1.649.
16. Borregaard N, Heiple JM, Simons ER, Clark RA. Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophils microbicidal oxidase: translocation during activation. *J Cell Biol* 1983; 97: 952-961.
17. Jesaitis AJ, Naemura JR, Painter RG, Sklar LA, Cochrane CG. Intracellular localization of N-formyl chemotactic receptor and Mg^{2+} dependent ATPase in human granulocytes. *Biochim Biophys Acta* 1982; 719: 556-568.
18. Scholl PR, Geha RS. Physical association between the high-affinity IgG receptor (Fc γ RI) and the α subunit of the high-affinity IgE receptor (Fc ϵ RI). *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8.847-8.850.
19. Soussi-Gounni A, Lamkhioued B, Christodoulouopoulos P, Nutku E, Hamid Q. Human neutrophils express the high affinity receptor for IgE (Fc ϵ RI). *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: S173.
20. Yamaoka KA, Arock M, Issaly F, Dugas N, Le Goff L, Kolb JP. Granulocyte macrophage colony stimulating factor induces Fc epsilon RII/CD23 expression on normal human polymorphonuclear neutrophils. *Int Immunol* 1996; 8: 479-490.
21. Vella A, Bellavite P, Adami A, Ortolani R, Benoni G, Carletto A, Biasi D, Caramaschi P, Tridente G. Expression of Fc(II/CD23) on human neutrophils isolated from rheumatoid arthritis patients. *Inflammation* 1999; 23: 471-479.
22. Truong MJ, Gruart V, Kusnierz JP, Papin JP, Loiseau S, Capron A et al. Human neutrophils express immunoglobulin E (IgE)-binding proteins (Mac2/ ϵ BP) of the S-type lectin family: Role in IgE-dependent activation. *J Exp Med* 1993; 117: 243-248.
23. Yamaoka A, Kuwabara I, Frigeri LG, Liu FT. A human lectin, galectin-3 (ϵ -BP/Mac2), stimulates superoxide production by neutrophils, *J Immunol* 1995; 154: 3.479-3.487.
24. Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Hill PN, Shenhav A, Kuwabara I, Chen SS. Modulation of functional properties of galectin-3 by monoclonal antibodies binding to the non-lectin domains. *Biochemistry* 1996; 14: 6.073-6.079.

25. Albrandt K, Orida NK, Liu FT. An IgE-binding protein with a distinctive repetitive sequence and homology with an IgG receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 6.859-6.863.
26. Robertson MW, Albrandt K, Keller D, Liu FT. Human IgE-binding protein: a soluble lectin exhibiting a highly conserved interspecies sequence and differential recognition of IgE glycoforms. *Biochemistry* 1990; 29: 8.093-8.099.
27. Ho MK, Springer TA. Mac-2, a novel 32.000 M mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1982; 128: 1.221-1.227.
28. Cherayil BJ, Weiner SJ, Pillai S. The Mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE. *J Exp Med* 1989; 170: 1.959-1.972.
29. Cherayil BI, Chaitovitz S, Wong C, Pillai S. Molecular cloning of a human macrophage lectin specific for galactose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7.342-7.330.
30. Ciprandi G, Buscaglia S, Pesce G, Passalacqua G, Rihoux JP, Bagnasco M, Canonica GW. Ceterizine reduces inflammatory cell recruitment and ICAM-1 (or CD54) expression on conjunctival epithelium in both early-and late-phase reactions after allergen-specific challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 612-621
31. Ciprandi G, Buscaglia S, Pesce GP, Ludice A, Bagnasco M, Canonica GW. Deflazacort protects against late-phase but not early-phase reactions induced by the allergen-specific conjunctival provocation test. *Allergy* 1993; 48: 421-430.
32. Ciprandi G, Buscaglia S, Catrullo A, Pesce G, Fiorino N, Montagna P, Bagnasco M, Canonica GW. Azelastine eye drops reduce and prevent allergic conjunctival reaction and exert anti-allergic activity. *Clin Exp Allergy* 1996; 27: 182-191.
33. Ciprandi G, Buscaglia S, Pronzato C, Benvenuti C, Cavalli E, Bruzzone F, Canonica GW. Oxotamide reduces inflammatory events induced by allergen-specific conjunctival challenge. *Ann Allergy* 1995; 75: 446-452.
34. Ciprandi G, Buscaglia S, Pesce GP, Bagnasco M, Canonica GW. Ocular challenge and hyperresponsiveness to histamine in patients with allergic conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 1227-1230.
35. Nomura K, Takamura E, Murato M, Fukagawa K, Uechi K. Quantitative evaluation of inflammatory cells in seasonal allergic conjunctivitis. *Ophthalmologica* 1997; 211: 1-3.
36. Knai J, Campbell A, Enander I, Peterson CGB, Michel FB, Bousquet J. Indirect evidence of nasal inflammation assessed by titration of inflammatory mediators and enumeration of cell in nasal secretions of patients with chronic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 880-889.

37. Miadona A, Milazzo N, Lorini M, Sala A, Tedeschi A. Nasal neutrophilia and release of myeloperoxidase induced by nasal challenge with platelet activatin factor: Different degrees of responsiveness in atopic and nonatopic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 947-954.
38. Pastorrelo EA, Riario-Sforza GG, Incorvaia C, Segala M, Fumagalli M, Gandini R. Comparison of rhinomanometry, symtom score, and inflamatory cell counts in assessing the nasal late-phase reaction to allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 878-890.
39. Gosset P, Malaquin F, Delneste Y, Wallaert B, Capron A, Joseph M, Tonnel AB. Interlukin-6 and interluekin-1 production is associated with antigen-induced late nasal response. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 878-890.
40. Durham SR, Ying S, Varney V, Jacobson MR, Sudderick RM, Mackay IS, Kay AB, Hamid QA. Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferón- γ . *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1356-1365.
41. Norzila MZ, Fakes K, Henry RL, Simpson J, Gibson PG. Interleukin-8 and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 200; 161: 769-774.
42. Fahy JV, Woo K, Liu J, Boushey HA. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthmma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 843-852.
43. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthmma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1532-1539.
44. Dupuis R, Collins DS, Koh YY, Pollice M, Albertine KH, Fish JE, Peters SP. Effects of antigen dose on the recruitment of inflammatory cells to the lung by segmental antigen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 850-857.
45. Díaz P, González C, Galleguillos FR, Ancic P, Cromwell O, Shepherd D, Durham SR, Gleich GJ, Kay AB. Leukocytes and mediators in bronchoalveolar lavage during allergen-induced late-phase asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 379-383.
46. Rossi GA, Crimi E, Lantero S, Wenzel SE, Voelkel NF. Inflammatory cells and eocosanoids mediators in subjects with late asthmatics responses and increases in airway responsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 1.076-1.084.
47. Nocker RET, Out TA, Weller FR, Mul EPJ, Jansen HM, Van der Zee JS. Influx of neutrophils into the airway lumen at 4h after segmental allergen challenge in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 119: 4.553.

48. Bascom R, Nacleiro RM, Fitzgerald TK, Kagey-Sobotka A, Proud D. Effect of ozone inhalation on the response to nasal challenge with antigen of allergic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 594-601.
49. Pliss LB, Ingenito EP, Ingram JRH, Pichurko B. Assessment of bronchoalveolar cell and mediator response to isocapnic hyperpnea in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 73-78.
50. Martin RJ, Cicutto LC, Smith HR, Ballard RD, Szeffler SJ. Airways inflammation in nocturnal asthma. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 351-357.
51. Georas SN, Liu MC, Newman W, Beall LD, Stealey RA, Bochner BS. Altered adhesion molecule expression and endothelial cell activation accompany the recruitment of human granulocytes to the lung after segmental antigen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7: 261-269.
52. Doherty D, Downey G, Worthen G, Haslett C, Henson P. Monocyte retention and migration in pulmonary inflammation: requirement for neutrophils. *Lab Invest* 1988; 59: 200-213.
53. Ollerenshaw SL, Woolcock AJ. Characteristics of the inflammation in biopsies from large airways of subjects with asthma and subjects with chronic airflow limitations. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 922-927.
54. Montefort S, Gratziau C, Goulding D, Polosa R, Haskard DO, Howarth PH, Holgate ST, Carroll MP. Bronchial biopsy evidence for leukocyte infiltration and upregulation of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules. *J Clin Invest* 1994; 93: 1.411-1.421.
55. Boulet LP, Turcotte H, Boutet M, Montminy L, Laviolette M. Influence of natural antigenic exposure on expiratory flows, methacholine responsiveness, and airway inflammation in mild allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 883-893.
56. Sur S, Crotty TB, Kephart GM, Hyma BA, Colby TV, Reed CE et al. Sudden-onset fatal asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 713-719.
57. Henson PM, Henson JE, Fittschen C, Bratton DL, Riches DWH. Degranulation and secretion by phagocytic cells. En: Gallin J.I, Golcistein I.M., Snyderman R., eds. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Nueva York: Raven Press, 1992; 511-539.
58. Dewald B, Bretz U, Baggiolini M. Release of gelatinase from a novel secretory compartment of human neutrophils. *J Clin Invest* 1982; 70: 518-525.
59. Fittschen C, Henson P. Selective secretion of azurophil granule contents induced by monovalent cation ionophores in human neutrophils: evidence for direct ionophore effects on the granule membrane. *J Leuk Biol* 1991; 50: 517-528.

60. Bainton DF. Sequential degranulation of the two types of polymorphonuclear leukocyte granule during phagocytosis of microorganisms. *J Cell Biol* 1973; 58: 249-264.
61. Fittschen C, Sanhaus R, Worthen G, Henson P. Bacterial lipopolysaccharide enhances chemoattractant-induced elastase secretion by human neutrophils. *J Leuk Biol* 1988; 43: 547-557.
62. Doherty D, Henson P, Clark R. Fibronectin fragments containing the RGDS cell-binding domain mediate monocyte migration into the rabbit lung: a potential mechanism for C₅ fragment-induced monocyte lung accumulation. *J Clin Invest* 1990; 86: 1.065-1.075.
63. Sugahara K, Cott G, Parson P, Manson R, Sanhaus R, Henson P. Epithelial permeability produced by phagocytosing neutrophils in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 875-881.
64. Smedly LA, Tonnesen MG, Sanhaus RA, Haslett C, Guthrie LA, Johnston RB et al. Neutrophil-mediated injury to endothelial cells: enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 1986; 77: 1.233-1.243.
65. Mendis AHW, Venaille TJ, Robinson BWS. Study of human epithelial cell detachment and damage: effects of proteases and oxidants. *Immunol Cell Biol* 1990; 68: 95-105.
66. Monteseirín J, Conde J, Prados M, Conejero A, Romero E. Differentiating atopic patients by means of α -1-antitrypsin phenotypes. *Allergol Immunopathol* 1984; 12: 111-114.
67. Monteseirín J, Conejero A, Conde J, Prados M, Toledo F, Muñoz J, Garcia J, Luna I, Romero E. Connection between two, peripheral markers in a group of asthmatic patients. *Allergol Immunopathol* 1985; 13: 509-512.
68. Monteseirín J, Prados M, Conde J. 1-Antitrypsin phenotypes and bronchial asthma. *Chest* 1994; 105: 1.905-1.906.
69. Selak MA, Chignard M, Smith JB. Cathepsin G is a strong platelet agonist released by neutrophils. *Biochem J* 1988; 251: 293-299.
70. Ferrer-López P, Renesto P, Schattner M, Bassot S, Laurent P, Chignard M. Activation of human platelet by recombinant C5a-stimulated neutrophils. A role for cathepsin G. *Am J Physiol* 1990; 255: H651.
71. Evangelista V, Raltar G, de Caetano G, White JG, Cerletti C. Platelet activation by fMLP-stimulated polymorphonuclear leukocytes: the activity of cathepsin G is not prevented by antiproteases. *Blood* 1991; 77: 2.379-2.384.
72. Speer CP, Pabst MJ, Hedegaard HB, Rest RF, Johnston RBJ. Enhanced release of oxygen metabolites by monocyte-derived macrophages exposed to proteolytic

- enzymes: activity of neutrophil elastase and cathepsin G. *J Immunol* 1984; 132: 2.151-2.156.
73. Sommerhoff CP, Nadel JA, Basbaum CB, Caughey GH. Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *J Clin Invest* 1990; 85: 682-689.
74. Kok P, Van Kessel M, Van Strijp JAG, Verhoef J. Inactivation of recombinant human Tumor Necrosis Factor by proteolytic enzymes released from stimulated human neutrophils. *J Immunol* 1991; 147: 3.862-3.868.
75. McColl SR, Showell HJ. Neutrophil-derived inflammatory mediators. En: Hellewell P, Williams TJ, eds. *Immunopharmacology of Neutrophils*. Londres: Academic Press, 1994; 55-94.
76. Kallenbach J, Baynes R, Fine B, Dajee D, Bezwoda W. Persistent neutrophil activation in mild asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 272-274.
77. Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 449-453.
78. Jacobi HH, Poulsen LK, Reimert CM., Skov PS, Ulfgren AK, Jones I, Eifman LB, Malling HJ, Mygind N. IL-8 and the activation of eosinophils and neutrophils following nasal allergen challenge. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 116: 53-59.
79. Palczynski C, Krakowiak A, Ruta U, Krajewska B, Rudzinski J, Gielec L, Rudzinski J, Gorski P. Nasal response to allergen challenge in patients with immediate asthmatic reaction. *Allergol Immunopathol* 1996; 24: 237-242.
80. Carlson M, Hakansson L, Peterson Ch, Stalenheim G, Venge P. Secretion of granule proteins from eosinophils and neutrophils is increased in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 27-33.
81. Carlson M, Hakansson L, Kämpe M, Stalenheim G, Peterson C, Venge P. Degranulation of eosinophil from pollen-atopic patients with asthma is increased during pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 131-139.
82. Carlson M, Peterson C, Venge P. The influence of IL3, IL-5, and GM-CSF on normal human eosinophil and neutrophil C3b-induced degranulation. *Allergy* 1993; 48: 437-442.
83. Winqvist I, Olofsson T, Oisson I. Mechanisms for eosinophil degranulation; release of the eosinophil cationic protein. *Immunology* 1984; 51: 1-8.
84. Bonilla I, Camacho MJ, Monteseirín J, Giner M, Asturias JA, Conde J. Elevated secretion of myeloperoxidase by neutrophils from asthmatic patients. The effect of immunotherapy. *Allergy* 2000; 55: 238.

85. Bonilla Garriguez I. Estudio fisiopatológico de la participación de los neutrófilos en la respuesta alérgica. Su posible modulación por fármacos. Universidad de Sevilla: Facultad de Medicina, 1998 (Tesis doctoral).
86. Bonilla I, Camacho MJ, Monteseirín J, Giner M, Martínez A, Conde J. IgE-dependent release of myeloperoxidase by allergens. *Allergy* 2000; 55: 11.
87. Monteseirín J, Prados M, Conde J. *Inmunopatología del eosinófilo*, 2ª ed. Sevilla: Editorial Castillejo, 1998.
88. Shalit M, Von Allmen C, Atkins PC, Zweiman B. Increased expression of CR3 (C3b) receptor on neutrophils in human inflammatory skin reactions. *J Clin Immunol* 1987; 7: 456-462.
89. Berends C, Hoekstra MO, Dijkhuizen B, De Monchy JGR, Gerritsen J, Kauffman HF. Expression of CD35 (CR1) and CD11b (CR3) on circulating neutrophils and eosinophils from allergic asthmatic children. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 926-933.
90. Arm JP, Walport MJ, Lee TH. Expression of complement receptor type 1 (CR 1) and type 3 (CR3) on circulating granulocytes in experimentally provoked asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 649-655.
91. Lundahl J, Skedinger M, Hed J, Johansson SGO, Zetterström O. Lability in complement receptor mobilization of granulocytes in patients with bronchial hyperactivity. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 834-838.
92. Frew AJ, Kay AB. The relationship between infiltrating CD4+ lymphocytes, activated eosinophils, and the magnitude of the allergen-induced late phase cutaneous reaction in man. *J Immunol* 1988; 141: 4.158-4.164.
93. Leiferman K, Fujisawa T, Gray BH, Gleich GJ. Extracellular deposition of eosinophil and neutrophil granule proteins in the IgE-mediated cutaneous late phase reaction. *Lab Invest* 1990; 62: 579-589.
94. Fleekop PD, Atkins PC, Von Allmen C, Valenzano MC, Shalit M, Zweiman B. Cellular inflammatory responses in human allergic skin reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80: 140-146.
95. Werfel S, Massey W, Lichtenstein LM, Bochner BS. Preferential recruitment of activated, memory T lymphocytes into skin chamber fluids during human cutaneous late-phase allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 57-65.
96. Shalit M, Valone FH, Atkins PC, Ratnoff WD, Goetzl EJ, Zweiman B. Late appearance of phospholipid platelet-activating factor and leukotriene B4 in human skin after repeated antigen challenged. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 83: 691.
97. Zweiman B, Kucich U, Shalit M, Von Allmen C, Moskovitz A, Weinbaum G, Atkins PC. Release of lactoferrin and elastase in human allergic skin reactions. *J Immunol* 1990; 144: 3.953- 3.960.

98. Atkins PC, Zweiman B, Littman B, Presti Ch, Von Allmen C, Moskovitz A, Eskra JD. Products of arachidonic acid metabolism and the effects of cyclooxygenase inhibition on ongoing cutaneous allergic reactions in human beings. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 742-747.
99. Massey W, Friedman B, Kato M, Cooper P, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Schleimer RP. Appearance of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor activity at allergen-challenged cutaneous late-phase reaction sites. *J Immunol* 1993; 150: 1.084-1.092.
100. Taylor MB, Zweiman B, Moskovitz AR, Von Allmen C, Atkins PC. Platelet-activating factor- and leukotriene B₄-induced release of lactoferrin from blood neutrophils from blood neutrophils of atopic and nonatopic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 740-748.
101. Zweiman B, Von Allmen C, Moskovitz A, Atkins P, Taylor M, Korchak H. Comparison of cytosolic calcium shifts, superoxide generation, and lactoferrin secretion in the neutrophils of atopics and nonatopics. *J Leukocyte Biol* 1993; 53: 727-731.
102. Hakansson L, Björnsson E, Janson Ch, Schmekel B. Increased adhesion to vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 of eosinophils from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 941-950.
103. Sánchez-Monteseirín H. Modificaciones IgE mediadas de las moléculas de adhesión en neutrófilos de pacientes alérgicos. Universidad de Sevilla: Facultad de Medicina, 1998 (Tesis doctoral).
104. Monteseirín J, Llamas E, Sánchez-Monteseirín H, Bonilla I, Camacho MJ, Giner M, Conde J. IgE-dependent expression of L-selectin (CD62L) and other adhesion molecules on neutrophils from allergic patients. *Allergy* 2000; 55: 83.
105. Monteseirín J, Llamas E, Sánchez-Monteseirín H, Bonilla I, Camacho MJ, Giner M, Conde J. IgE-mediated expression of L-selectin (CD62L) on lymphocytes from asthmatic patients. *Allergy* 2000; 55: 231.
106. Rabier M, Damon M, Chanez P, Mencia Huerta JM, Braquet P, Bousquet J, Michel FB, Godard P. Neutrophil chemotactic activity of PAF, histamine, and neuromediators in bronchial asthma. *J Lipid Mediator* 1991; 4: 265-275.
107. Radeau T, Chavis C, Damon M, Michel FB, Crastes De Paulet A, Godard PH. Enhanced arachidonic acid metabolism and human neutrophil migration in asthma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1990; 41: 131-138.
108. Miyagawa H, Okada C, Sugiyama H, Hopp RJ, Agrawal DK, Bewtra AK, Townley RG. Variations in chemotaxis and chemokinesis of neutrophils of different densities from patients with allergic rhinitis. *Ann Allergy* 1991; 67: 515-519.

109. Condino-Neto A, Vilela MMS, Cambiucci EC, Ribeiro JD, Guglielmi AAG, Magna LA et al. Theophylline therapy inhibits neutrophil and mononuclear cell chemotaxis from chronic asthmatic children. *Br J Pharmacol* 1991; 32: 557-561.
110. Hakansson L, Carlson M, Stalenheim G, Venge P. Migratory responses of eosinophil and neutrophil granulocytes from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 743-750.
111. Venge P, Henriksen J, Dahl R, Hakansson L. Exercise-induced asthma and the generation of neutrophil chemotactic activity. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 498-504.
112. Moscato G, Rampulla C, Dellabianca A, Dorigo N, Majani U, Corsico R. et al. Increased neutrophil chemotactic activity in exercise- and "fog"-induced asthma. *Allergy* 1986; 41: 581-587.
113. Sastre J, Banks DE, López M, Barkman HW, Salvaggio JE. Neutrophil chemotactic activity in toluene diisocyanate (TDI)-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 567-572.
114. Nagy L, Lee TH, Kay AB. Neutrophil chemotactic activity in antigen-induced late asthmatic reactions. *N Engl J Med* 1982; 306: 497-501.
115. Sprenger JD, Altman LC, Marshall SG, Pierson WE, Koenig JQ. Studies of neutrophil chemotactic factor of anaphylaxis in metabisulfite sensitivity. *Ann Allergy* 1989; 62: 117-121.
116. Kowalski ML, Grzegorzczak J, Sliwinska-Kowalska M, Wojciechowska B, Rozniecka M, Rozniecki J. Neutrophil chemotactic activity (NCA) in nasal secretions from atopic and nonatopic subjects. *Allergy* 1993; 48: 409-414.
117. Nagakura T, Onda T, Ikura Y. *In vitro* and *in vivo* antigen-induced release of high-molecular weight neutrophil chemotactic activity from human nasal tissue. *Am J Rhinology* 1988; 2: 7-11.
118. Mackay JA, Cromwell O, Kay AB. Allergen-induced released of high molecular weight neutrophil chemotactic activity in nasal secretions from patients with allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77: 183.
119. Miyagawa H, Okada C, Sugiyama H, Hopp RJ, Agrawal DK, Nabe M. et al. Density distribution and density conversion of neutrophils in allergic subjects. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; 98: 8-13.
120. Miyagawa H, Okada C, Sugiyama H, Hopp RJ, Agrawal DK, Nabe M. et al. Density change of neutrophils from allergic subjects by granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Ann Allergy* 1993; 71: 396-400.
121. Colditz IG, Movat HZ. Desensitization of acute inflammatory lesions to chemotaxis and endotoxin. *J Immunol* 1984; 133: 2.163-2.168.

122. Hosni R, Chabannes B, Pacheco Y, Moliere P, Grosclaude M, Fayolle MP et al. Leukotriene B₄ levels from stimulated neutrophils from healthy and allergic subjects: effect of platelets and exogenous arachidonic acid. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 631-637.
123. Radeau T, Godard P, Chavis C, Crastes de Paulet A, Damon M. Enhanced esterification process of 5-hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE) in PIVIN from asthmatic patients. *Prostaglandins* 1992; 43: 583-594.
124. Misso NL, Gillon RL, Taylor ML, Stewart GA, Thompson PJ. Acetyl-CoA: lyso-platelet-activating factor acetyltransferase activity in neutrophils from asthmatic patients and normal subjects. *Clin Sci* 1993; 85: 455-463.
125. Chabannes B, Hosni R, Moliere P, Croset M, Pacheco Y, Perrin-Fayole M, Lagarde M. Leukotriene B₄, level in neutrophils from allergic and healthy subjects stimulated by low concentration of calcium ionophore A23187. Effect of exogenous arachidonic acid and possible endogenous source. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1093: 47-54.
126. Maloney CG, Kutchera WA, Albertine KH, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Inflammatory agonist induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. *J Immunol* 1998; 160: 1.4021.410.
127. Aizawa T, Tamura G, Ohtsu H, Takishima T. Eosinophil and neutrophil production of leukotriene C₄ and B₄: comparison of cells from asthmatic subjects and healthy donors. *Ann Allergy* 1990; 69: 287-292.
128. Radeau T, Chavis C, Godard PH, Michel FB, Crastes de Paulet A, Damon M. Arachidonate 5-Lipoxygenase metabolism in human neutrophils from patients with asthma. *in vitro* effect of Nedocromil Sodium. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 97: 209-215.
129. Nakamura T, Kuriyama M, Ishihara K, Matsumura Y, Myamoto T. Platelet-Activating Factor (PAF) in allergic diseases: inhibitory effects of anti-allergic drugs, ketotifen, and three kampo medicine on PAF production. *Lipids* 1991; 26: 1.297-1.300.
130. Kroegel C, Matthys H. Platelet-activating factor-induced human eosinophil activation. Generation and release of cyclooxygenase metabolites in human blood eosinophils from asthmatics. *Immunology* 1993; 78: 279-285.
131. Giner M, Gayoso F, Monteseirín J, Bonilla I, Camacho MJ, Martinez A, Conde J. Expression and activity of Prostaglandin Endoperoxidase Synthase-2 (COX-2) by stimulation IgE-dependent in neutrophils from allergic patients. *Allergy* 2000; 55: 231.
132. Kato M, Nakano M, Morikawa A, Kimura H, Shigeta M, Kurume T. Ability of polymorphonuclear leukocytes to generate active oxygen species in children with bronchial asthma. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991; 95: 17-22.

133. Styrts B, Rocklin RE, Klempner MS. Characterization of the neutrophil respiratory burst in atopy. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81: 20-26.
134. Meltzer S, Goldberg B, Lad P, Easton J. Superoxide generation and its modulation by adenosine in the neutrophils of subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 960-966.
135. Joseph BZ, Sustiel AM, Borish L. Neutrophils from asthmatics exhibit diminished responsiveness to 2-Chloroadenosine which is reversed by theophylline. *Inflammation* 1992; 16: 101-116.
136. Kanazawa H, Kurihara N, Hirata K, Takeda T. The role of free radicals in airway obstruction in asthmatic patients. *Chest* 1991; 100: 1.319-1.322.
137. Zoratti EM, Sedgwick JB, Vrtis RR, Busse WW. The effect of platelet activating factor on the generation of superoxide action in human eosinophils and neutrophils. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 745.
138. Kanazawa H, Kurihara N, Hirata K, Terakawa K, Takeda T. Hyporesponsiveness to inhibitory agents of alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes primed by Platelet Activating Factor. *Jpn J Allergol* 1993; 42: 131-135.
139. Monteseirín J, Camacho MJ, Montano R, Llamas E, Conde M, Carballo M, Guardia P, Conde J, Sobrino F. Enhancement of antigen-specific functional responses by neutrophils from allergic patients. *J Exp Med* 1996; 183: 2.571-2.579.
140. Camacho Herrera MJ. Activación antígeno-específica de los neutrófilos de pacientes alérgicos. Universidad de Sevilla: Facultad de Medicina, 1997 (tesis doctoral).
141. Schmid E, Figala V, Roth D, Ullrich V. Antioxidant and neutrophil-inhibiting properties of new 2-O-Methyl-6(alkylthio) ascorbic acid derivatives. *J Med Chem* 1993; 36: 4.021-4.029.
142. Sato K, Zweiman B, Moskovitz AR, Von Allmen C, Lane A, Atkins PC. Effects of skin-chamber fluids from human allergic reactions on neutrophil activation. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 21-31.
143. Briheim G, Stendahl O, Dahlgren C. Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1984; 45: 1-5.
144. Daniels RH, Finnem MJ, Hill ME, Lackie JM. Recombinant human monocyte IL-8 primes NADPH-oxidase and phospholipase A, activation in human neutrophils. *Immunology* 1992, 75: 157-163.
145. Wozniak A, Betts WH, Murphy GA, Rokicinski M. Interleukin-8 primes human neutrophils for enhanced superoxide anion production. *Immunology* 1993; 79: 608-615.

146. Walz A, Meloni F, Clark-Lewis I, Von Tscharner V, Baggiolini M. $[Ca^{2+}]_i$ changes and respiratory burst in human neutrophils and monocytes induced by NAP1/interleukin-8, NAP-2, and gro/MGSA. *J Leukoc Biol* 1991; 50: 279.
147. Baggiolini M, Imboden P, Detmers P. Neutrophil activation and the effects of interleukin8/neutrophil-activating peptide-1 (IL-8/Nap-1). *Cytokines* 1992; 4: 1.
148. Wang JF, Komarov P, Sies H, De Groot H. Contribution of nitric oxide synthase to luminol-dependent chemiluminescence generated by phorbol ester-activated Kupffer Cells. *J Biochem* 1991; 279: 311.
149. Wang JF, Komarov P, Sies H, De Groot H. Inhibition of superoxide and nitric oxide release and protection from reoxygenation injury by ebselen in rat Kupffer cells. *Hepatology* 1992; 15: 1.112.
150. Doherty NS, Janusz M. Neutrophil Proteases. Their physiological and pathological roles. En: Hellewell P, Williams TJ, eds. *Immunopharmacology of Neutrophils*. Londres: Academic Press 1994; 55-94.
151. Page SM, Gleich GJ, Roebuck KA, Thomas LL. Stimulation of neutrophil interleukin-8 production by eosinophil granule major basic protein. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21: 230-237.
152. Nocker RET, Schoonbrood DFM, Van de Graaf EA, Hack CE, Lutter R, Jansen HM, Out TA. A Interleukin-8 in airway inflammation in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 109: 183-191.
153. Ordoñez CL, Shaughnessy TE, Matthay MA, Fahy JV. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1.185-1.190.
154. Gosset P, Tillie-Leblond I, Malaquin F, Durieu J, Waliaert B, Tonnel AB. Interleukin-8 secretion in patients with allergic rhinitis and allergen challenge: interleukin-8 is not the main chemotactic factor present in nasal lavages. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 379-388.
155. Teran L, Carroll M, Frew AJ, Montefort S, Lau LCK, Davies DE, Lindley I, Howarth PH, Church MK, Holgate ST. Neutrophil influx and interleukin-8 release after segmental allergen or saline challenge in asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107: 374-375.
156. Conde M, Bonilla I, Carballo M, Camacho MJ, Monteseirín J, Conde J. Crosslinking of IgE-bound to neutrophil membrane stimulates IL-8 production through a Ca^{2+} calcineurin-dependent. *Allergy* 2000; 55: 261.
157. Gustafsson R, Fredens K, Nettelbladt O and Hällgren R. Eosinophil activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 414-422.

158. Shock A, Rabe KF, Dent G, Chambers RC, Gray AJ, Chung KF, Barnes PJ, and Laurent GJ. Eosinophils adhere to stimulate replication of lung fibroblast “*in vitro*”. *Clin Exp Immunol* 1991; 86: 185-190.
159. Lundgren JD, Davey RT Jr, Lundgren B, Mullol J, Marom Z, Logun C, Baraniuk J, Kaliner MA, and Shelhamer JH. Eosinophil cationic protein stimulates and major basic protein inhibits airway mucus secretion. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 689-698.
160. Patella V, De Crescenzo G, Marino I, Genovese A, Adt M, Gleich GJ, Marone G. Eosinophil granule proteins activate human heart mast cells. *J Immunol*: 1996; 157: 1219-1225.
161. Peterson CGB, Skoog V, and Venge P. Human eosinophil cationic proteins (ECP and EPX) and their suppressive effects on lymphocyte proliferation. *Immunobiology* 1986; 171: 1-13.
162. De Monchy JG, Kauffman HF, Venge P, Koeter GH, Cansen HM, Sluiter HJ, De Vries K. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 373-376.
163. Ädelroth E, Rosenhall L, Johansson S, Linden M, Venge P. Inflammatory cells and eosinophilic activity in asthmatics investigated by bronchoalveolar lavage. The effects of anti-asthmatic treatment with budesonide or terbutaline. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 142: 91-99.
164. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J. Eosinophilic inflammation in asthma. *New England J Med*. 1990; 323: 1033-1039.
165. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Enander I, Venge P, Peterson C, Ahlstedt S, Michel FB, Godard P. Indirect evidence of bronchial inflammation assessed by titration of inflammatory mediators in BAL fluid of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1991; 88: 649-660.
166. Vignola AM, Chanez P, Campbell AM, Souques F, Lebel B, Enander I, Bousquet J. Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157: 403-409.
167. Ferguson AC, Whitelaw M, Brown H. Correlation of bronchial eosinophil and mast cell activation with bronchial hyperresponsiveness in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1992; 90: 609-613.
168. Aalbers R, De Monchy JG, Kauffman HF, Smith M, Hoekstra Y, Vrugt B, Tiwens W. Dynamics of eosinophil infiltration in the bronchial mucosa before and after the late asthmatic reaction. *Eur Respir J*. 1993; 6: 840-847.
169. Oddera S, Silvestri M, Balbo A, Jovovich BO, Penna R, Crimi E, Rossi GA. Airway eosinophilic inflammation, epithelial damage, and bronchial

- hyperresponsiveness in patients with mild – moderate, stable asthma. *Allergy* 1996; 51: 100-107.
170. Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey HA. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1126-1131.
171. Claman DM, Boushey HA, Liu J, Wong H, Fahy JV. Analysis of induced sputum to examine the effects of prednisone on airway inflammation in asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 1994; 94: 861-869.
172. Louis R, Shute J, Biagi S, Stanciu L, Marrelli F, Tenar H, Hidi R, Djukanovic R. Cell infiltration, ICAM-1 expression, and eosinophil chemotactic activity in asthmatic sputum. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155: 466-472.
173. Ronchi MC, Piragino C, Rosi E, Stendardi L, Tanini A, Galli G, Duranti R, Scano G. Do sputum eosinophils and ECP relate to the severity of asthma?. *Eur Respir J* 1997; 10: 1809-1813.
174. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, Gleich GJ, Dolovich J, Hargreave FE. Indices of airways inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154: 308-317.
175. Virchow JCJr, Kroegel C, Hage U, Kortsik C, Matthys H., Werner P. Comparison of sputum-ECP levels in bronchial asthma and chronic bronchitis. *Allergy* 1993; 48: S112-S118.
176. Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey HA. Comparison of sample collected by sputum induction and bronchoscopy from asthmatic and healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 125: 53-58.
177. Pizzichini E, Pizzichini MM, Kidney JC, Efthimiadis A, Hussack P, Popou T, Dolovich J, O'Byrne, Hargreave FE. Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared. *Eur Respir J* 1998; 11: 828-834.
178. Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell YM, Barnes PJ. Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit. Care Med* 1997; 155: 542-548.
179. Sorva R, Metso T, Turpeinen M, Juntunen-Bekman K, Björkstén F, Haahtela T. Eosinophil cationic protein in induced sputum as a marker of inflammation in asthmatic children. *Pediatr Allergy Immunol.* 1997; 8: 45-50.
180. Klementsson H, Svensson C, Andersson M, Venge P, Pipkorn U, Persson CG. Eosinophils, secretory responsiveness and glucocorticoid-induced effects on the nasal mucosa during a weak pollen season. *Clin Exp Allergy* 1991; 21: 705-710.

181. Svensson C, Andersson M, Persson CG, Venge P, Alkner U, Pipkorn U. Albumin, bradykinins, and eosinophil cationic protein on the nasal mucosal surface in patients with hay fever during natural allergen exposure. *J Allergy Clin Immunol.* 1990; 85: 828-833.
182. Wang D, Clement P, Smitz J, Derde MP. Concentrations of chemical mediators in nasal secretions of patients with hay fever during natural allergen exposure. *Acta Otolaryngol Stockh* 1994; 114: 552-555.
183. Nishioka K, Saito C, Nagano T, Okano M, Masuda Y, Kuriyama T. Eosinophil cationic protein in the nasal secretions of patients with mite allergic rhinitis. *Laryngoscope* 1993; 103: 189-192.
184. Bisgaard H, Grönborg H, Mygind N, Dahn R, Lindvist N, Venge P. Allergen-induced increase of eosinophil cationic protein in nasal lavage fluid: Effect of the glucocorticoid budesonide. *J Allergy Clin. Immunol.* 1990; 85: 891-895.
185. Klementsson H, Venge P, Andersson M, Pipkorn U. Allergen induced changes in nasal secretory responsiveness and eosinophil granulocytes. *Acta Oto-Laryngologica* 1991; 111: 776-784.
186. Van Toorenenbergen AW, Van Wijk RG, Vermeulen AM, Zijlstra FJ. Increase of albumin, eosinophil cationic protein, histamine, leukotrienes and mast cell tryptase in nasal lavage fluid after challenge with inhalant allergen extract. *Agents Actions* 1992; 36: C421-C424.
187. Wang D, Clement P, Smitz J, De Waele M, Derde MP. Correlations between complaints, inflammatory cells and mediator concentrations in nasal secretions after nasal allergen challenge and during natural allergen exposure. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1995; 106: 278-285.
188. Konno A, Yamakoshi T, Terada N, Fujita Y. Mode of action of a topical steroid on immediate phase reaction after antigen challenge and nonspecific nasal hyperreactivity in nasal allergy. *Int Arch. Allergy Immunol.* 1994; 103: 79-87.
189. De Graaf-in't Veld C, Garrelds IM, Jansen AP et al. Effect of intranasal fluticasone propionate on the immediate and late allergic reaction and nasal hyperreactivity in patients with a house dust mite allergy. *Clin. Exp. Allergy* 1995; 25: 966-973.
190. Venge P. Soluble markers of allergic inflammation. *Allergy* 1994; 21: 561-567.
191. Wever AMJ, Wever-Hess J, Hermans J. The use of serum eosinophil cationic protein (ECP) in the management of steroid therapy in chronic asthma. *Clin. Exp. Allergy* 1997; 27: 55-73.
192. Baba k, Sekii T, Yoshida K et al. Usefulness of serum ECP value as an indicator to adjust doses of inhaled steroids in adult bronchial asthma treatment. *Clin Allergy* 1997; 17: 55-73.

193. Iikura Y, Matsumoto T, Kuwahata K et al. Evaluation of serum eosinophil cationic protein (ECP) for monitorin of childhood asthma: as a marker for indication and discontinuation of inhaled steroid therapy. *Allergol Immunol*. 1997; 4: 92-103.
194. Koller DY, Herouy Y, Götz M, Hagel E, Urbanek R, Eichler I. Clinical value of monitoring eosinophil activity in asthma. *Arch Dis Chlid* 1995; 73: 413-417.
195. Venge P, Bystrom J, Carlson M, Hakansson L, Karawacjzyk M, Peterson C, Seveus L, Trulson A. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 1.172-1.186.
196. Abu-Ghazaleh R, Dunnette ST, Loegering DA, Checkel JL, Kita H, Thomar LL, Gleich GJ. Eosinophil granule proteins in peripheral blood granulocytes. *J leukoc Biol* 1992; 52: 611-618
197. Sur S, Glitz DG, Kita H, Kujawa SM, Peterson EA, Weiler DA, Kephart GM, Wager JM, George TJ, Gleich GJ, Leiferman KM. Localization of eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein in neutrophilic leukocytes. *J Leukoc Biol* 1998; 63: 715-722.
198. Kita H, Kaneko M, Bartemes KR, Weiler DA, Schimming AW, Reed CE, Glekh GT. Does IgE bind to and activate eosinophils from patients with allergy?. *J Immunol* 1999; 162: 6.901-6.911.
199. Tomassini M, Tsicopouhns A, Tai PC, Gruart V, Tonnel AB, Prin L, Capron A, Capron M. Release of granule proteins by eosinophils from allergic and nonallergic patients with eosinophilia on immunoglobulin-dependent activation. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 365-375.
200. Monteseirín J, De la Calle A, Delgado J, Guardia P, Bonilla I, Camacho MJ, Llamas E, Conde J. Antigen receptor signalling. *Allergol Immunopathol* 1996; 24: 185-192.
201. Carballo M, Márquez G, Conde M, Martin-Nieto J, Monteseirin J, Conde J et al. Characterization of calcineurin in human neutrophils. *J Biol Chem* 1999; 274: 93-100.
202. Giner M, Monteseirín J, Gayoso F, Camacho MJ, Bonilla I, García C, Conde J. IgE-dependent activation of different PKC isoforms in neutrophils from allergic patients. *Allergy* 2000; 55: 80.
203. Soerensen M, Soerensen SPL. The protein in whey. *C R Trav Lab Carlsberg* 1939; 23: 55-99.
204. Johansson BG. Isolation of an iron containing red protein from human milk. *Acta Chem Scand* 1960; 14: 510-512.

205. Masson PL, Heremans JF, Schonme E. Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J Exp Med* 1966; 130: 643.
206. Baggiolini M, de Duve C, Masson PL, Heremans JF. Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes. *J Exp Med* 1970; 131: 559.
207. Spitznagel JK, Dalldorf FG, Leffell MS, Folds JD, Welsh IRH, Cooney MH, Martin LE. Character of azurophil and specific granules purified from human polymorphonuclear leukocytes. *Lab Invest* 1974; 30: 774.
208. Hansen NE, Malmquist J, Thorell J. Plasma myeloperoxidase and lactoferrin measured by radioimmunoassay: relations to neutrophil kinetics. *Acta Med Scand* 1975; 198: 473.
209. Olofsson T, Olsson I, Venge P. Myeloperoxidase and lactoferrin of blood neutrophils and plasma in chronic granulocytic leukaemia. *Scand J Haematol* 1977; 18: 113.
210. Metz Boutigue MH, Jolles J, Mazurier J, Schoentgen F, Legrand D, Spik G, Montreuil J, Jolles. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur J Biochem* 1984; 145: 659-676.
211. Bullen JJ, Griffiths E. Iron and infection: molecular physiological and clinical aspects. Great Britain Wiley Interscience 1987:1.
212. Furmanski P, Li ZP, Fortuna MB, Swamy CVB, Das MR. Multiple molecular forms of human lactoferrin. *J Exp Med* 1989; 170: 415-429.
213. Baker ED, Lindely PF. New perspectives on the structure and function of transferrins. *J Inorgan Biochem* 1993; 47: 147-160.
214. Querinjean P, Masson PL y Heremans JF. Molecular weight, single chain structure and aminoacid composition of human lactoferrin. *Eur J Biochem* 1971; 20: 420.
215. Aisen Ph y Leibman A. Lactoferrin and transferrin: a comparative study. *Biochim Biophys Acta* 1972; 257: 314.
216. Querinjean P, Masson PL, Heremans JF. Molecular weight, single chain structure and aminoacid composition of human lactoferrin. *Eur J Biochem* 1971; 20: 420-425.
217. Farnaud S, Evans R. Lactoferrin a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology* 2003; 40: 395-405.
218. Kanyshkova TG, Buneva VN, Nevinsky A. Lactoferrin and its biological functions. *Biochemistry* 2001; 66: 1-7.
219. Iyer S, Libnerdal B. Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *Eur J Clin Nutr* 1993; 47: 232-241.

220. Aisen P, Leibman A, Zweier J. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J Biol Chem* 1978; 253: 1.930-1.935.
221. Makey DG, Seal US. The detection of four molecular forms of human transferrin during the iron binding process. *Biochim Biophys Acta* 1976; 453:250-256.
222. Makino Y, Kwaanishi E. High performance liquid chromatographic separation of human apotransferrin and monoferric and diferric transferrins. *J Chromatogr* 1991; 567: 248-53.
223. Makino Y, Nishimura S. High performance liquid chromatographic separation of human apoLactoferrin and monoferric and diferric lactoferrins. *J Chromatogr* 1992; 579: 346-349.
224. Furmanski P, Li ZP. Multiple forms of lactoferrin in normal and leukemic human granulocytes. *Exp Hematol* 1990; 18: 932-935.
225. Van Berkel PH, Pieper FR, de Boer HA, Nuijens JH. Glycosylated and unglycosylated human lactoferrins both bind iron and show identical affinities towards human lysozyme and bacterial lipopolysaccharide, but differ in their susceptibilities towards tryptic proteolysis. *Biochem J* 1995; 312: 107-114.
226. Kawakami H, Lannerdal B. Isolation and function of a receptor for human lactoferrin in human fetal intestinal brush border membranes. *Am J Physiol* 1991; 261: G841-G846.
227. Derisbourg P, Wieruszeski JM, Montreuil J, Spik G. Primary structure of glycans isolated from human leukocyte lactotransferrin. Absence of fucose residues questions the proposed mechanism of hyposidaemia. *Biochem J* 1990; 269: 821-825.
228. Brines RD, Brock JH. The effect of trypsin and chymotrypsin on the in vitro antimicrobial and iron binding properties of lactoferrin in human milk and bovine colostrum. Unusual resistance of human apoLactoferrin to proteolytic digestion. *Biochim Biophys Acta* 1983; 759: 229-235.
229. Bennett RM, Mohla CT. A solid phase radio-immunoassay for the measurement of lactoferrin in human plasma: variations with age, sex and disease. *J Lab Clin* 1976; 88: 156-166.
230. Bluard Deconinck JM, Masson PL, Osinski PA, Heremans JF. Amino acid sequence of cystic peptides of lactoferrin and demonstration of similarities between lactoferrin and transferrin. *Biochim Biophys Acta* 1974; 365: 311-317.
231. Johansson BG. Isolation of crystalline lactoferrin from human milk. *Acta Chem Scand* 1969; 23: 683-684.
232. Bennett RM, Kokocinski T. Lactoferrin turnover in man. *Clin Sci* 1979; 57: 453.

233. Newman R, Schneider CL, Sutherland R, Vodinelich L, Greaves M. The transferrin receptor. *TIBS* 1982; 7: 397.
234. Van Snick JL, Masson PL. The binding of human lactoferrin to mouse peritoneal cells. *J Exp Med* 1976; 144: 1.568.
235. Birgens HS. The biological significance of lactoferrin in haematology. *Scand J Haematol* 1984; 33: 22-30.
236. Bagby GC. Regulation of granulopoiesis: the lactoferrin controversy. *Blood Cells* 1989; 15: 386-399.
237. Saito N, Takemori N, Hirai K, Onodera R, Watanabe S, Naidl M. Ultrastructural localization of lactoferrin in the granules other than typical secondary granules of human neutrophils. *Human Cell* 1993; 6: 42-48.
238. Baynes R, Bezwoda W, Bothwell T, Khan Q, Mansoor N. The non immune inflammatory response: serial changes in plasma iron, iron binding capacity, lactoferrin, ferritin and C reactive protein. *Scand J Clin Lab Invest* 1986; 46: 695-704.
239. Olofsson T, Olsson I, Venge P, Elgefors B. Serum myeloperoxidase and lactoferrin in neutropenia. *Scand J Haematol* 1977; 18: 73-80.
240. Scott PH. Enzyme immunoassay of lactoferrin in newborn term infants: reference values and influence of diet. *Ann Clin Biochem* 1989; 26: 407-411.
241. Masson PL, Heremans JF, Ferin J. Presence of an iron binding protein (lactoferrin) in the genital tract of the female. I. Its immunohistochemical localization in the endometrium. *Fertil Steril* 1968; 19:679-89.
242. Niemeli A, Kulomaa M, Vilja P, Tuohimaa P, Saarikoski S. Lactoferrin in human amniotic fluid. *Hum Reprod* 1989; 4: 99-101.
243. Antonsen S, Wiggers P, Dalhoj J, Blaabjerg O. An enzyme linked immunosorbent assay for plasma lactoferrin. Concentrations in 362 healthy, adult blood donors. *Scand J Clin Lab Invest* 1993; 53:133-44.
244. Sykes JAC, Thomas MJ, Goldie DJ, Turner GM. Plasma lactoferrin levels in pregnancy and cystic fibrosis. *Clin Chem Acta* 1982; 122: 385-393.
245. Rosenmund A, Friedl J, Bebie H, Straub PW. Plasma lactoferrin/neutrophils ratio. A reassessment of normal values and of the clinical relevance. *Acta Haematol* 1988; 80: 40-48.
246. Bezwoda WR, Baynes RD, Khan Q, Mansoor N. Enzyme linked immunosorbent assay for lactoferrin. Plasma and tissue measurements. *Clin Chim Acta* 1985; 151: 61-69.

247. Freeman KLB, Anderson DC, Hughes B, Buffone GJ. Rapid radiometric assay used to assess lactoferrin in granulocytes. *Clin Chem* 1985; 31: 407-409.
248. Andrews WC, Bonsnes RW. The leucocytes during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1951; 61: 1.129-1.135.
249. Oberg G, Lindmark G, Moberg L, Venge P. Peroxidase activity and cellular content of granule protein in PMN during pregnancy. *Br J Haematol* 1983; 55: 701-706.
250. Masson DY, Taylor CR. Distribution of transferrin, ferritin, and lactoferrin in human tissues. *J Clin Pathol* 1978; 31: 316-327.
251. Cruickshank JM, Morris R Jr, Butt WR, Crooke AC. The relationship of total and differential leucocyte counts with urinary oestrogen and plasma cortisol levels. *J Obstet Gynecol Br Commonw* 1970; 77: 634-639.
252. Cohen MS, Britigan BE, French M, Bean K. Preliminary observations on lactoferrin secretion in human vaginal mucus: variation during the menstrual cycle, evidence of hormonal regulation, and implications for infection with *Neisseria gonorrhoeae*. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157: 1.122-1.125.
253. Antonsen S. Within subject variation of elastase/al protease inhibitor complexes and lactoferrin in plasma. *Scan J Clin Lab Invest* 1993; 53: 611-616.
254. Van Sande M, Van Camp K. Lactoferrin in human prostate tissue. *Urol Res* 1981; 9: 241-244.
255. Van Snick JL, Masson PL, Heremans JF. The involvement of lactoferrin in the hyposideremia of acute inflammation. *J Exp Med* 1974; 140: 1.068-1.084.
256. Maher RJ, Cao D, Boxer LA, Petty HR. Simultaneous calcium dependent delivery of neutrófilos lactoferrin and reactive oxygen metabolites to erythrocyte targets: evidence support ing granule-dependent triggering of superoxide deposition. *J Cell Physiol* 1993; 156: 226-234.
257. Kahler S, Christophers E, Schroder JM. Plasma lactoferrin of reflects neutrófilos activation in psoriasis. *Br J Dermatol* 1988; 119: 289-293.
258. Kolb E. Recent knowledge of the structure and function of lactoferrin and ferritin. *Zeitschrift fur Die Gesamte Innere Medizin Und Ihre Grenzgebiete* 1989; 44: 345-350.
259. Ismail M, Brock JH. Binding of lactoferrin and transferrin to the human promonocytic cell line U937. *J Biol Chem* 1993; 268: 21.618-21.625.
260. Hu WL, Regoeczi E, Chindemi PA, Bolyos M. Lactoferrin interferes with uptake of iron from transferrin and asialotransferrin by the rat liver. *Am J Physiol* 1993; 264: G 112-117.

261. Birgens HS, Kristensen LO, Borregaard N, Karle H, Hansen NE. Lactoferrin-mediated transfer of iron to intracellular ferritin in human monocytes. *Eur J Haematol* 1988; 41:52-7.
262. Hutchens TW, Henry JF, Yip TT, Hachey DL, Schonler RS, Motil KJ, Garza C. Origin of intact lactoferrin and its DNA binding fragments found in the urine of human milk-fed preterm infants. Evaluation by stable isotopic enrichment. *Pediatr Res* 1991; 29: 243-250.
263. Goldman AS, Gang C, Schanler RJ, Goldblum RM. Molecular forms of lactoferrin in stool and urine from infants fed human milk. *Pediatr Res* 1990; 27: 252-255.
264. Rochard E, Legrand D, Mazurier J, Montreuil J, Spik G. The N-terminal domain I of human lactoferrin binds specifically to phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood human lymphocyte receptor. *FEBS Lett* 1989; 255: 201-207.
265. Yu RH, Schryvers AB. Regions located in both the N-lobe and C-lobe of human lactoferrin participate in the binding interactions with bacterial lactoferrin receptors. *Microb Pathog* 1993; 14: 343-353.
266. Raphael GD, Davis JL, Fox PC, Malech HL, Gallin JJ, Baraniuk JN, Kalimer MA. Glandular secretion of lactoferrin in a patient with neutrophil lactoferrin deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84:914-919.
267. Vil de JL, Breton Gorius J, Buriot D, Griscelli C. Congenital and acquired lactoferrin deficiencies in neutrophils. *Adv Exp Med Biol* 1982; 141: 611-620.
268. Zagulski T, Lipinski P, Zagulska A, Broniek S, Jarzabek Z. Lactoferrin can protect mice against a lethal dose of *Escherichia coli* in experimental infection *in vivo*. *Br J Exp Pathol*. 1989; 70: 697-704.
269. Jensen MS, Baiton DF. Temporal changes in pH with the phagocytic vacuole of the polymorphonuclear leukocyte. *J Cell Biol* 1973; 56: 379.
270. Bullen JJ, Armtrons JA. The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leukocytes. *Immunology* 1979; 36: 781.
271. Ambruso DR, Johnston RB. Lactoferrin enhances hydroxyl radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fractions and enzymatic generating system. *J Clin Invest* 1981; 67: 352.
272. Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, Kawaze K, Tomita M. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J Appl Bacteriol* 1992; 73: 472-479.
273. Yamauchi K, Tomita M, Giehl TJ, Ellison RT. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin derived lactoferrin peptide fragment. *Infect Immun* 1993; 61: 719-728.

274. Naidu SS, Svensson U, Kishore AR, Naidu AS. Relationship between antibacterial activity and porin binding of lactoferrin in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 240-245.
275. Palma C, Serbousek D, Torosantussi A, Cassone A, Djen JY. Identification of a mannoprotein fraction from *Candida albicans* that enhances human polymorphonuclear leucocyte (PMN) functions and stimulates lactoferrin in PMNL inhibition of candidal growth. *J Infect Dis* 1992; 166: 1.103-1.112.
276. Bellamy W, Wakabayashi H, Takase M, Kawase K, Shimamura S, Tomita M. Killing of *Candida albicans* by lactoferrin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Med Microbiol Immunol* 1993; 182: 97-105.
277. Baynes RD, Bewoda WP, Mansoor N. Neutrófilos lactoferrin content in viral infections. *Am J Clin Pathol* 1988; 89: 225-228.
278. Orla M, Conneely PhD. Antiinflammatory activities of lactoferrin. *J Am College of nutrition* 2001; 20: 389-395.
279. Skogh T, Peen E. Lactoferrin, anti-lactoferrin antibodies and inflammatory disease. *Adv Exp Med Biol* 1993; 336: 533-538.
280. Rainard P. Activation of the classical pathway of complement by binding to unencapsulated *Streptococcus agalactiae*. *Immunology* 1993; 79: 648-652.
281. Fairweather Tait SJ, Balmer SE, Scott PH, Ninski MJ. Lactoferrin and iron absorption in newborn infants. *Pediatr Res* 1987; 22: 651-654.
282. Probable role of lactoferrin in the transport of iron across the intestinal brush border. *Nutr Rev* 1980; 38: 256-257.
283. Masson PL, Heremans JF. Lactoferrin in milk from different species. *Comp Biochem Physiol* 1971; 39B: 119-129.
284. Davidson LA, Snnerdal B. Fe saturation and proteolysis of human lactoferrin: effect on brush border receptor mediated uptake of Fe^{2+} and Mn^{2+} . *Am J Physiol* 1989; 257: G930-G934.
285. Machnicki M. Biological properties of lactoferrin. *Folia Biologica* 1991; 37:65-76.
286. Weinberg ED. Iron and infection. *Microbiol Rev* 1978; 42: 45.
287. Kampschmidt RF, Upchurch HF, Eddington CL. Multiple biological activities of a partially purified leukocytic endogenous mediator. *Ame J Physiol* 1973; 224: 530.
288. Klemner MS, Dinarello CA, Gallin JI. Human leukocyte pyrogen induces release of specific granule contents from human neutrophils. *J Clin Invest* 1978; 61: 1.330.

289. Hansen NE, Karle H, Andersen V, Malmquist J y Hoff GE. Neutrophilic granulocytes in acute bacterial infection. Sequential studies on lysozyme, myeloperoxidase and lactoferrin. *Clin Exp Immunol* 1976; 26: 463.
290. Richie ER, Hiliard JK, Gilmore R, Gillepsie DJ. Human milk derived lactoferrin inhibits mitogen and alloantigen induced human lymphocyte proliferation. *J Reprod Immunol* 1987; 12: 137-148.
291. Crouch SPM, Slater KJ, Fletcher J. Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. *Blood* 1992; 80: 235-240.
292. Garre C, Bianchi Scarra G, Sirito M, Musso M, Ravazzolo R. Lactoferrin binding sites and nuclear localization in K562(S) cells. *J Cell Physiol* 1992; 153: 447-482.
293. Vercellotti G, Stroncek D, Jacob HS. Granulocyte oxygen radicals as potential suppressors of hemopoiesis: potentiating roles of lactoferrin and elastase, inhibitory role of oxygen radical scavengers. *Blood Cells* 1987; 13: 199-206.
294. Broxmeyer HE, Moore MAS. Communication between white cells and the abnormalities of this in leukemia. *Biochim Biophys Acta* 1978; 516: 129.
295. Masson DY. Intracellular lysozyme and lactoferrin in myeloproliferative disorders. *J Clin Pathol* 1977; 39: 344.
296. Maneva A, Taleva B, Manev V, Sirakov L. Lactoferrin binding to human platelets. *Int J Biochem* 1993; 25: 707-712.
297. Leveugle B, Mazurier J, Legrand D, Mazurier C, Montreuil J, Spik G. Lactotransferrin binding to its platelet receptor inhibits platelet aggregation. *Eur J Biochem* 1993; 213:1205-1211.
298. Wu G, Ruan C, Drouet L, Caen J. Inhibition effects of KRDS, a peptide derived from lactotransferrin, on platelet function and arterial thrombus formation in dogs. *Haemostasis* 1992; 22: 1-6.
299. Brock J. Lactoferrin: a multipotencial immunoregulatory protein?. *Immunol Today* 1995; 16: 417-419.
300. Travis SM, Conway RA, Zabner J, Smith JJ, Anderson NN, Singh PK, Greenberg EP, Welsh HJ. Activity of abundant antimicrobials of the human airway. *Am J Respir Cell Moll Biol* 1999; 20: 872-879.
301. Thomas L, Xu W, Ardon TT. Immobilized lactoferrin is a stimulus for eosinophil activation. *J Immunol* 2002; 169: 993-999.
302. Baranovskii AG, Buneva VN, Nevinsky GA. Human deoxyribonucleases. *Biochemistry* 2004; 69: 587-601.

303. Sorimachi K, Akimoto K, Hattori Y, Ieiri T, Niwa A. Activation of macrophages by lactoferrin: secretion of TNF- α , IL-8 and NO. *Biochem Mol Biol Int* 1997; 43: 79-87.
304. He S, McEuen AR, Blewett SA, Li P, Buckley MG, Leufkens P, Walls AF. The inhibition of mast cell activation by neutrophil lactoferrin: uptake by mast cells and interaction with tryptase, chymase and cathepsin G. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 1.007-1.015.
305. Elrod KC, Moore WR, Abraham WM, Tanaka RD. Lactoferrin, a potent tryptase inhibitor, bolishes late-phase airway responses in allergic sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 375-381.
306. Pejler G. Lactoferrin regulates the activity of heparin proteoglycan-bound mast cell chymase: characterization of the binding of heparin to lactoferrin. *Biochem J* 1996; 320: 897-903.
307. Hallgren J, Estrada S, Karlson U, Alving K, Pejler G. Heparin antagonists are potent inhibitors of mast cell tryptase. *Biochemistry* 2001; 40: 7.342-7.349.
308. Rice KD, Tanaka RD, Katz BA, Numerof RP, Moore WR. Inhibitors of tryptase for the treatment of mast cell-mediated diseases. *Curr Pharm Des* 1998; 4: 381-396.
309. Monteseirin J, Chacón P, Vega A, Bonilla I, Guardia P, Sobrino F, Conde J. ¿Es el neutrófilo una célula reguladora del eosinófilo en los procesos alérgicos mediados por la IgE?. *Alergol Immunol Clin* 2004; 19: 7-12.
310. Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax* 2002; 57: 643-648.
311. Monteseirin J, Chacon P, Vega A, El Bekay R, Alvarez M, Alb G, Conde M, Jimenez J, Asturias JA, Martinez A, Conde J, Pintado E, Bedoya FJ, Sobrino F. Human neutrophils synthesize IL-8 in an IgE-mediated activation. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 692-700.
312. Monteseirin J, Bonilla I, Camacho MJ, Conde J, Sobrino F. IgE-dependent release of myeloperoxidase by neutrophils from allergic patients. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:889-892.
313. Monteseirin J, Bonilla I, Camacho MJ, Chacón P, Vega A, Chaparro A, Conde J, Sobrino F. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 131: 174-181.
314. Chakravarty N. The role of protein kinase C in histamine secretion from mast cells. *Acta Physiol Scand* 1990; 139: 319-331.
315. Coward WR, Sagara H, Wilson SJ, Holgate ST, Church MK. Allergen activates peripheral blood eosinophil nuclear factor κ B to generate granulocyte macrophage-colony stimulating factor, tumor necrosis factor- α and interleukin-8. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1.071-1.078.

316. Fukutomi O, Kondo N, Agata H, Shinoda S, Kuwabara N, Shinbara M, Inoue R, Orii T. Identification of monocyte chemotactic factors in supernatants of ovalbumin-stimulated lymphocytes from patients with atopic dermatitis who are sensitive to hen's egg. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 359-366.
317. Haselden BM, Syrigou E, Jones M, Huston D, Ichikawa K, Chapman MD, Kay AB, Larché M. Proliferation and release of IL-5 and IFN- γ by peripheral blood mononuclear cells from cat-allergic asthmatics and rhinitis, non-cat-allergic asthmatics, and normal controls to peptides derived from Fel d 1 chain 1. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 349-356.
318. Gagnon R, Akoum A, Hébert J. Lol p I-induced IL-4 and IFN- γ production by peripheral blood mononuclear cells of atopic and nonatopic subjects during and out of the pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 950-956.
319. Plötz SG, Traudt-Hoffmann C, Feussner I, Kasche A, Feser A, Ring J, Jakob T, Behrendt H. Chemotaxis and activation of human peripheral blood eosinophils induced by pollen-associated lipid mediators. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 1.152-1.160.
320. Prinz JC, Endres N, Rank G, Ring J, Rieber EP. Expression of Fc epsilon receptors on activated human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1987; 17: 757-761.
321. Maezawa Y, Nakajima H, Seto Y, Suto A, Kumano K, Kubo S, Karasuyama H, Saito Y, Iwamoto I. IgE-dependent enhancement of Th2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *Clin Exp Immunol* 2004; 135: 12-18.
322. Maezawa Y, Nakajima H, Kumano K, Kubo S, Karasuyama H, Iwamoto I. Role of IgE in Th2 cell-mediated allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 131: 2-6.
323. Gosset P, Tillie-Leblond I, Oudin S, Parmentier O, Wallaert B, Joseph M, Tonnel AB. Production of chemokines and proinflammatory and antiinflammatory cytokines by human alveolar macrophages activated by IgE receptors. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 289-297.
324. Gosset P, Tsiocopoulos A, Wallaert B, Joseph M, Capron A, Tonnel AB. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by human mononuclear phagocytes from allergic asthmatics after IgE-dependent stimulation. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 768-774.
325. Tamaoki J, Sakai N, Kanemura T, Yamawaki I, Takizawa T. IgE-dependent activation of alveolar macrophages augments neurally mediated contraction of small airways. *Br J Pharmacol* 1991; 103: 1.458-1.462.
326. Mossalayi MD, Paul-Eugene N, Ouaz F, Arock M, Kolb JP, Kilchherr E, Debre P, Dugas B. Involvement of Fc epsilon RII/CD23 and L-arginine-dependent pathway in IgE-mediated stimulation of human monocyte functions. *Int Immunol* 1994; 6: 931-934.

327. Paul-Eugene N, Kolb JP, Abadie A, Gordon J, Delespesse G, Sarfati M, Mencia-Huerta JM, Braquet P, Dugas B. Ligation of CD23 triggers cAMP generation and release of inflammatory mediators in human monocytes. *J Immunol* 1992; 149: 3.066-3.071.
328. Maurer D, Fiebiger E, Reininger B, Wolff-Winiski B, Jouvin MH, Kilgus O, Kinet JP, Stingl G. Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (Fc epsilon RI) on monocytes of atopic individuals. *J Exp Med* 1994; 179: 745-750.
329. MacDermot J, Joseph S, Dollery CT. The identity of IgE receptors (Fc epsilon RII) that mediate cellular activation of human macrophages: evidence against a role for CD23. *Mol Immunol* 1992; 29: 71-76.
330. Gushchin IS, Chitaeva VG, Prozorovsky NS. Control of Allergen-Induced Histamine Secretion by Human Basophils with F(ab) of Anti-IgE Antibodies. *Russ J Immunol* 1997; 2: 37-40.
331. Moneret-Vautrin DA, Sainte-Laudy J, Kanny G, Fremont S. Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 82: 33-40.
332. Ishizaka T, White JR, Saito H. Activation of basophils and mast cells for mediator release. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 82: 327-332.
333. Monteseirín J, Llamas E, Muñoz F, Bono MJ, Conde J. Relationship of blood EG2+ eosinophils in patients with bronchial asthma. *Allergol Immunopathol* 1993; 21: 97-99.
334. Sedgwick JB, Calhoun WJ, Gleich GJ, Kita H, Abrams JS, Schwartz LB, Volovitz B, Ben-yaakou M, Busse WW. Immediate and late allergic allergic responsal to segmental antigen. Characterization of eosinophil and mast cell mediators. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1.274-1.281.
335. Collins DS, Dupuis R, Gleich GJ, Bartemes KR, Ko YY, Police M. Immunoglobulin E-mediated increase in vascular permeability correlates with eosinophilic inflammation. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 677-683.
336. Capron M, Spiegelberg HL, Prin L, Bennich H, Butterworth AE, Pierce RJ. Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. *J Immunol* 1984; 132: 462-468.
337. Capron M, Jouault T, Prin L, Joseph M, Ameisen JC, Butterworth AE. Functional study of a monoclonal antibody to IgE Fc receptor (FcεRII) of eosinophils, platelets, and macrophages. *J Exp Med* 1986; 164: 72-89.
338. Truong MJ, Gruart V, Liu FT, Prin L, Capron A, Capron M. IgE-binding molecules (Mac-2/sBP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophils cytotoxicity. *Eur J Immunol* 1993; 23: 3.230-3.235.

339. Gounni AS, Lamkhioued B, Occhiali K, Tanaka Y, Delaporte E, Capron A, Capron M. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* 1994; 367: 183-186.
340. Kita H, Kaneko M, Frigas E, Bartemes KR, Weiler DA, Gleich GJ. Eosinophils from hay fever patients degranulate in response to IgG, but not to IgE. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 339.
341. Humbert M, Grant JA, Taboorda-Barata L, Durham SR, Pfister R, Menz G, Barkans J, Ying S, Kay AB. High-affinity IgE receptor (FcεIR)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and nonatopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1.931-1.937.
342. Sihra BS, Kon OM, Grant JA, Kay AB. Expression of high-affinity IgE receptors (FcεIR) on peripheral blood basophils, monocytes, and eosinophils in atopic subjects: Relationship to total serum IgE concentrations. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 699-706.
343. Seminario MC, Saini SS, MacGlashan DW, Bochner BS. Intracellular expression and release of FcεRIa by human eosinophils. *J Immunol* 1999; 162: 6.893-6.900.
344. Terada N, Konno Y, Terada S, Fukuda T, Yamashita T. IL-4 upregulates FcεRIa messenger RNA in eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 96: 1.161-1.169.
345. Saini SS, Klion AD, Holland SM, Hamilton RG, Bochner BS, MacGlashan DW. The relationship serum IgE and surface levels of FcεR on human leukocytes in various diseases: Correlation of expression with FcεRI on basophils but not on monocytes or eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 514-520.
346. Moqbel R, Walsh GM, Nagakura T, MacDonald AJ, Wardlaw AJ, Likura Y, Kay AB. The effect of platelet-activating factor on IgE binding to, and IgE-dependent biological properties of human eosinophils. *Immunology* 1990; 70: 251-257.
347. Khalife J, Dunne DW, Richardson BA, Mazza G, Thorne KJI, Capron A, Butterworth AE. Functional role of human IgG subclasses in eosinophil mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 1989; 142: 4.422-4.427.
348. Kaneko M, Swanson MC, Gleich GJ, Kita H. Allergen-specific IgG1 and IgG3 through Fc gamma RII induce eosinophil degranulation. *J Clin Invest* 1995; 95: 2.813-2.815.
349. Butterworth AE, Remold HG, Houba V, David JR, Franks D, David PH, Sturrock RF. Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to Cr-labeled of schistosomula of *Schistosoma mansoni*: Mediation by IgG, and inhibition by antigen-antibody complexes. *J Immunol* 1977; 118: 2.230-2.236.
350. Capron M. Eosinophils: receptors and mediators in hypersensitivity. *Clin Exp Allergy* 1989; 19: 3-8.

351. Rossi RE, Monasterolo G, Operti D. A comparative study of the tryptase release test and the cellular allergen stimulation test (CAST) in mite sensitive patients. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 752-757.
352. Looney RJ, Pudiak D, Rosenfeld SI. Cytokine production by mite-specific T cells from donors with mild atopic disease. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 476-483.
353. Windelborg Nielsen B, Hansen B, Damsgaard TM, Herlin T, Soderberg U, Bjerke T, Thestrup-Pedersen K, Schiøtz PO. Basophil histamine release induced by anti-IgE and concanavalin A. Relation to the total plasma IgE content. *Allergy*. 1993; 48: 54-61.
354. Tanizaki Y, Komagoe H, Sudo M, Morinaga H, Kitani H, Tada S, Takahashi K, Kimura I. Histamine release from whole blood induced by anti-IgE: relationship to patient age, age at onset and serum IgE levels. *Acta Med Okayama*. 1984; 38: 275-280.
355. Miyamoto T, Akiyama K, Ohta K, Urata C, Horiuchi Y. Studies in atopic asthma with emphasis on correlation among various tests and various antibodies. *J Allergy Clin Immunol*. 1981; 67: 279-284.
356. Bryant DH, Burns MW, Lazarus L. The correlation between skin tests, bronchial provocation tests and the serum level of IgE specific for common allergens in patients with asthma. *Clin Allergy* 1975; 5: 145-157.
357. Kerrebijn KF, Degenhart HJ, Hammers A. Relation between skin tests, inhalation tests, and histamine release from leucocytes and IgE in house-dust mite allergy. *Arch Dis Child* 1976; 51: 252-258.
358. Banuelos Arias Adel C, Montano Velazquez BB, Campillo Navarrete MR, Mojica Martinez MD, Ayala Balboa JC, Silva Vera RI, Cisneros Salazar MR, Becerril Angeles M, Ruiz Hinojosa A, Jauregui Renaud K. Skin tests, serum specific IgE and total IgE in the diagnosis of patients with perennial allergic rhinitis *Rev Alerg Mex* 2003; 50: 147-153.
359. Loukides S, Bouros D, Papatheodorou G, Panagou P, Siafakas NM. The relationships among hydrogen peroxide in expired breath condensate, airway inflammation, and asthma severity. *Chest* 2002; 121: 338-346.
360. Louis R, Lau LC, Bron AO, Roldaan AC, Radermecker M, Djukanovic R. The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 9-16.
361. Little SA, MacLeod KJ, Chalmers GW, Love JG, McSharry C, Thomson NC. Association of forced expiratory volume with disease duration and sputum neutrophils in chronic asthma. *Am J Med* 2002; 112: 446-452.
362. Pradalier A. Late-phase reaction in asthma: basic mechanisms. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 101: 322-325.

363. Fabbri LM, Boschetto P, Zocca E, Milani G, Pivrotto F, Plebani M, Burlina A, Licata B, Mapp CE. Bronchoalveolar neutrophilia during late asthmatic reactions induced by toluene diisocyanate. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 36-42.
364. Durham SR, Carroll M, Walsh GM, Kay AB. Leukocyte activation in allergen-induced late-phase asthmatic reactions. *N Engl J Med* 1984; 311: 1.398-1.402.
365. Asman B, Strand V, Bylin G, Bergstrom K. Peripheral neutrophils after allergic asthmatic reactions. *Int J Clin Lab Res* 1997; 27: 185-188.
366. Dente FL, Carnevali S, Paggiaro PL, Cianchetti S, Bacci E, Bancalari L, Di Franco A, Giannini D, Vagaggini B, Giuntini C. Relationship between serum heat-stable neutrophil chemotactic activity during early airway reaction to allergen and the pattern of airway response (early versus late reactions) in asthmatic subjects. *Respiration* 1997; 64: 285-290.
367. Kraft M, Bettinger CM, Wenzel SE, Irvin CG, Ackerman SJ, Martin RJ. Methacholine challenge does not affect bronchoalveolar fluid cell number and many indices of cell function in asthma. *Eur Respir J* 1995; 8: 1.966-1.971.
368. White MV. Nasal cholinergic hyperresponsiveness in atopic subjects studied out of season. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 278-287.
369. Park HS, Jung KS. Enhanced neutrophil chemotactic activity after bronchial challenge in subjects with grain dust-induced asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998; 80: 257-262.
370. Upham JW, Denburg JA, O'Byrne PM. Rapid response of circulating myeloid dendritic cells to inhaled allergen in asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 818-823.
371. Twentyman OP, Sams VR, Holgate ST. Albuterol and nedocromil sodium after airway and leukocyte responses to allergen. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1.425-1.430.
372. Baroody FM, Ford S, Proud D, Kagey- Sobotka A, Lichtenstein L, Naderio RM. Relationship between histamine and physiological changes during the early response to nasal antigen provocation. *J Appl Phhysiol* 1999; 86: 659-668.
373. Silvestri M, Oddera S, Sacco O, Balbo A, Crimi E, Rossi GA. Bronchial and bronchoalveolar inflammation in single early and dual responders after allergen inhalation challenge. *Lung* 1997; 175: 277-285.
374. Rossi GA, Crimi E, Lantero S, Gianiorio P, Oddera S, Crimi P, Brusasco V. Late-phase asthmatic reaction to inhaled allergen is associated with early recruitment of eosinophils in the airways. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 379-383.

375. Calhoun WJ, Bush RK. Enhanced reactive oxygen species metabolism of airspace cells and airway inflammation follow antigen challenge in human asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 306-313.
376. Smith HR, Larsen GL, Cherniack RM, Wenzel SE, Voelkel NF, Westcott JY, Bethel RA. Inflammatory cells and eicosanoid mediators in subjects with late asthmatic responses and increases in airway responsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 1.076-1.084.
377. Lemiere C, Romeo P, Chaboillez S, Tremblay C, Malo JL. Airway inflammation and functional changes after exposure to different concentrations of isocyanates. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 641-646.
378. Park HS, Jung K, Kim H, Nahm D, Kang K. Neutrophil activation following TDI bronchial challenges to the airway secretion from subjects with TDI-induced asthma. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 1.395-1.401.
379. Kim SS, Park HS, Yoon HJ, Lee YM, Lee SK, Nahm DH. Enhanced serum neutrophil chemotactic activity was noted in both early and late asthmatic responses during lysine-aspirin bronchoprovocation test in ASA-sensitive asthmatic patients. *J Korean Med Sci* 2003; 18: 42-47.
380. Hohlfield JM, Ahlf K, Enhorning G, Balke K, Erpenbeck VJ, Petschallies J, Hoymann HG, Fabel H, Krug N. Dysfunction of pulmonary surfactant in asthmatics after segmental allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1.803-1.809.
381. Kelly EA, Busse WW, Jarjour NN. Increased matrix metalloproteinase-9 in the airway after allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1.157-1.161.
382. Teran LM, Carroll MP, Frew AJ, Redington AE, Davies DE, Lindley I, Howarth PH, Church MK, Holgate ST. Leukocyte recruitment after local endobronchial allergen challenge in asthma. Relationship to procedure and to airway interleukin-8 release. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 469-476.
383. Liu MC, Proud D, Lichtenstein LM, Hubbard WC, Bochner BS, Stealey BA. Effects of prednisone on the cellular responses and release of cytokines and mediators after segmental allergen challenge of asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 29-38.
384. Liu MC, Hubbard WC, Proud D, Stealy BA, Galli SJ, Kagey-Sobotka A, Beecker ER, Lichtenstein LM. Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics: cellular, mediator, and permeability changes. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 51-58.
385. Virchow JC Jr, Walker C, Hafner D, Kartsik C, Werner P, Matthys H, Kroegel C. T cells and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 960-968.

386. Calhoun WJ, Reed HE, Moest DR, Stevens CA. Enhanced superoxide production by alveolar macrophages and air-space cells. Airway inflammation, and alveolar macrophage density changes after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 317-325.
387. Erpenbeck VJ, Hohlfekl JM, Volkmann B, Hagenberg A, Geldmacher H, Braun A, Krug N. Segmental allergen challenge in patients with atopic asthma leads to increased IL-9 expression in bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 1.319-1.327.
388. Cataldo DD, Gueders M, Munaut C, Rocks N, Bartsch P, Foidart JM, Noel A, Louis R. Matrix metalloproteinase-9, but not tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, increases in the sputum from allergic asthmatic patients after allergen challenge. *Chest* 2002; 122: 1.553-1.559.
389. Kelly EA, Busse WW, Jarjour NN. Increased matrix metalloproteinase-9 in the airway after allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1.157-1.161.
390. Fahy JV, Steiger DJ, Liu J, Basbaum CB, Finkbeiner WE, Boushey HA. Markers of mucus secretion and DNA levels in induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1.132-1.137.
391. Van de Graaf EA, Out TA, Kobesen A, Cansen HM. Lactoferrin and secretory IgA in the bronchoalveolar lavage fluid from patients with a stable asthma. *Lung* 1991; 169: 275-283.
392. Tsokos M, Paulsen F. Expression of pulmonary lactoferrin in sudden-onset and slow-onset asthma with fatal outcome. *Virchows Arch* 2002; 441: 494-499.
393. Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 2001; 119: 1.329-1.336.
394. Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1.360-1.368.
395. He S, McEuen AR, Blewett SA, Li P, Buckley MG, Leufkens P, Walls AF. The inhibition of mast cell activation by neutrophil lactoferrin: uptake by mast cells and interaction with tryptase, chymase and cathepsin G. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 1.007-1.015.
396. Cregar L, Elrod KC, Putnam D, Moore WR. Neutrophil myeloperoxidase is a potent and selective inhibitor of mast cell tryptase. *Arch Biochem Biophys.* 1999; 366: 125-130.
397. Micillo E, Bianco A, D'Auria D, Mazzarella G, Abbate GF. Respiratory infections and asthma. *Allergy* 2000; 55: 42-45.

398. Gern JE. Viral and bacterial infections in the development and progression of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: S497-S502.
399. Sokhandan M, McFadden ER Jr, Huang YT, Mazanec MB. The contribution of respiratory viruses to severe exacerbations of asthma in adults. *Chest* 1995; 107: 1.570-1.574.
400. Bianco A, Mazarella G, Bresciani M, Paciocco G, Spiteri MA. Virus-induced asthma. *Monaldi Arch Chest Dis* 2002; 57: 188-90.
401. Kraft M. The role of bacterial infections in asthma. *Clin Chest Med* 2000; 21: 301-313.
402. Seganti L, Di Biase AM, Marchetti M, Pietrantonio A, Tinari A, Superti F. Antiviral activity of lactoferrin towards naked viruses. *Biometals*. 2004; 17: 295-299.
403. Ward PP, Conneely OM. Lactoferrin: role in iron homeostasis and host defense against microbial infection. *Biometals* 2004; 17: 203-208.
404. Ward PP, Uribe-Luna S, Conneely OM. Lactoferrin and host defense. *Biochem Cell Biol* 2002; 80: 95-102.
405. Van der Strate BW, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DK. Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res* 2001; 52: 225-239.
406. Schryvers AB, Bonnah R, Yu RH, Wong H, Retzer M. Bacterial lactoferrin receptors. *Adv Exp Med Biol* 1998; 443: 123-133.
407. Chierici R. Antimicrobial actions of lactoferrin. *Adv Nutr Res*. 2001; 10: 247-269.
408. Araki H, Katayama N, Yamashita Y, Mano H, Fujieda A, Usui E, Mitani H, Ohishi K, Nishii K, Masuya M, Minami N, Nobori T, Shiku H. Reprogramming of human postmitotic neutrophils into macrophages by growth factors. *Blood* 2004; 103: 2.973-2.980.
409. Shinoda I, Takase M, Fukuwatari Y, Shimamura S, Koller M, Konig W. Effects of lactoferrin and lactoferricin on the release of interleukin 8 from human polymorphonuclear leukocytes. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996; 60: 521-523.

ABREVIATURAS CIENTÍFICAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
APC	Célula presentadora de antígeno
AR.....	Artritis Reumatóide
ARN.....	Ácido ribonucleico
ARNm.....	Ácido ribonucleico mensajero
BAL	Lavados broncoalveolares
BPI.....	Proteína inductora bactericida
BSA	Albúmina de suero bovino
CAP	Proteína catiónica antimicrobial
CFU-GM.....	Unidad formadora de colonias granulocitos/monocitos
CFU-S.....	Célula madre pluripotencial
COX.....	Ciclooxigenasa
CsA	Ciclosporina
CSA	Actividad estimuladora de colonias
ECP.....	Proteína catiónica del eosinófilo
EDN.....	Neurotoxina del eosinófilo
ELISA.....	Enzima inmunoensayo
EPO.....	Peroxidasa del eosinófilo
EPX.....	Proteína eosinofílica X
FcεRI	Receptor de alta afinidad para la IgE
FcεRII.....	Receptor de baja afinidad para la IgE
FEV ₁	Volumen máximo espirado en el primer segundo
fMLP.....	N-formil-L-metionil-L-fenilalanina
GM-CSF	c granulocitos/monocitos
GVB.....	Bufer gelatina veronal
HNP	Péptidos de neutrófilos humanos
HOCl.....	Ácido Hipocloroso
IFN.....	Interferón
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
kDa	Kilo Daltons

LAK	Células killer activadas
LF	Lactoferrina
LPS	Lipopolisacáridos
LT	Leucotrienos
LZ	Lisozima
MBP	Proteína básica mayor
M-CSF	Factor estimulador de colonias de mononucleares
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
MMP	Metaloproteinasa
MPC-1	Proteína quimiotáctica del monolito-1
MPO	Mieloperoxidasa
NADPH	Nicotinamida dinucleótido fosfato
NF	Factor nuclear
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
OH	Hidroxilo
OPD	Orto-fenilendiamina
PAF	Factor activador de plaquetas
PAM	Adenosina monofosfato
PBS	Solución salina tamponada con fosfatos
PG	Prostaglandinas
pI	Punto isoeléctrico
PKC	Proteincinasas C
Pm	Peso molecular
PMN	Polimorfonucleares
PRF	Peak-flow (pico de flujo)
RES	Retículo endoplasmático
ROS	Especies reactivas de oxígeno (radicales de oxígeno)
SLE	Síndrome del Lupus Eritematoso
TNF	Factor de necrosis tumoral
TX	Tromboxanos
VEMS	Volumen máximo espirado en el primer segundo
VIP	Péptido intestinal vasoactivo