

TESIS DOCTORAL

TITULO:

"MEDIADORES DE LA INFLAMACION (PROTEINA CATIONICA DEL EOSINOFILO-ECP) EN EL ASMA BRONQUIAL Y RINITIS ALERGICA"

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA CENTRAL**

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 15 número 168 del libro
correspondiente 24
Sevilla, 24

El Jefe del Departamento de Teoría,

Elvira Raffelle

AUTOR: Francisco Javier Alvarez Gutiérrez

DIRECTOR: José Castillo Gómez

A mi director de
tesis y maestro
Dr.D.José Castillo Gómez...

A mi esposa Gracia
e hijos Fátima y Javier,
por el tiempo que les
he robado.....

Quiero mostrar mi más
sincero agradecimiento al
Dr. Valenzuela Mateos y al
personal técnico de nuestro
laboratorio de fisiopatología
por su apoyo y eficaz trabajo.

INDICE DE MATERIAS

I. INTRODUCCION.....	1
I.1. ASMA BRONQUIAL. DEFINICIONES	2
I.2. RESPUESTA ASMATICA PRECOZ(RAP) Y TARDIA(RAT).....	5
I.3. INFLAMACION.DEFINICION.ASPECTOS GENERALES.....	7
I.4. INFLAMACION Y RESPUESTA ALERGICA.....	9
I.5. INFLAMACION EN OTRAS ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.....	11
I.6. LA INFLAMACION EN EL ASMA.....	12
I.6.1. EVIDENCIAS ANATOMOPATOLOGICAS.....	12
I.6.1.1. Estudios en necropsias.....	12
I.6.1.2. Biopsias bronquiales.....	13
I.6.1.3. Lavado Broncoalveolar (BAL).....	16
I.6.2. CELULAS PARTICIPANTES.....	18
I.6.2.1. Mastocitos y Basófilos.....	18
I.6.2.2. Monocitos y Macrófagos.....	20
I.6.2.3. Neutrófilos.....	22
I.6.2.4. Linfocitos.....	24
I.6.2.5. Plaquetas.....	26
I.6.2.6. Células epiteliales.....	27
I.7. EL EOSINOFILO.....	29
I.7.1. PRODUCCION.....	29
I.7.1.1. Eosinopoyesis.....	29
I.7.1.2. Factores estimulantes de colonias (CSF)....	30

I.7.2.CICLO VITAL-CINETICA.....	31
I.7.3.ESTRUCTURA.....	33
I.7.4.CONSTITUYENTES CELULARES Y FUNCIONES.....	34
I.7.4.1.Proteínas de la membrana.....	34
I.7.4.2.Proteínas granulares.....	35
I.7.4.2.1.Proteína básica mayor (MBP).....	37
I.7.4.2.2.Neurotoxina derivada de los eosinófilos (EDN).....	38
I.7.4.2.3.Peroxidasa de los eosinófilos (EPO).....	39
I.7.4.3.Otras enzimas y mediadores.....	40
I.7.5.EOSINOFILOS DE BAJA DENSIDAD Y DESGRANULACION....	41
I.7.6.FACTORES QUIMIOTACTICOS Y ACTIVADORES.....	43
I.8.LA PROTEINA CATIONICA DEL EOSINOFILO (ECP).....	46
I.8.1.PROPIEDADES BIOQUIMICAS-LOCALIZACION.....	46
I.8.2.FUNCIONES.....	49
I.8.3.ECP COMO MEDIADOR INFLAMATORIO EN EL ASMA.....	50
I.8.3.1.Datos en biopsias bronquiales.....	50
I.8.3.2.Datos en Lavado Broncoalveolar (BAL).....	51
I.8.3.3.Datos en suero.....	53
I.8.3.4.Datos en otras muestras.....	55
I.9.OTROS MEDIADORES IMPLICADOS EN LA INFLAMACION.....	56
I.9.1.MEDIADORES PREFORMADOS.....	56
I.9.2.MEDIADORES DE NUEVA SINTESIS.....	57
I.9.2.1.eicosanoides.....	57
I.9.2.2.Factor activador de las plaquetas.....	63
I.9.3.PEPTIDOS MEDIADORES.....	64
I.9.4.ADENOSINA.....	66
I.9.5.CITOQUINAS.....	68
I.9.6.RADICALES LIBRES.....	71

I.10.EFECTOS DE LOS CORTICOIDES EN EL ASMA BRONQUIAL.....	73
I.10.1.Efectos sobre la producción de células inflamatorias.....	73
I.10.2.Efectos sobre la función de las células inflamatorias.....	75
I.10.3.Efectos en el asma bronquial.....	78
I.11.LA RINITIS ALERGICA.....	81
I.11.1.RELACION CON EL ASMA BRONQUIAL.....	81
I.11.2.RINITIS ALERGICA E INFLAMACION.....	82
I.11.2.1.Estudios citológicos.....	82
I.11.2.2.Mediadores de la inflamación en lavados nasales. Efecto de los esteroides.	84
I.11.2.3.Eosinófilos y ECP en sangre.....	87
II.JUSTIFICACION-OBJETIVOS.....	89
II.1.JUSTIFICACION DEL TRABAJO.....	90
II.2.OBJETIVOS.....	91
III.MATERIAL Y METODOS.....	92
III.1.POBLACION.....	93
III.2.EVALUACION CLINICA.....	97
III.3.PRUEBAS DE ALERGIA.....	100
III.4.PRUEBASDEFUNCIONPULMONAR.....	102
I.4.1. ESPIROMETRIA FORZADA.....	102
I.4.2. TEST DE PROVOCACION CON METACOLINA.....	102
III.5.PRUEBAS DE LABORATORIO.....	104
I.5.1.HEMOGRAMA.....	104

I.5.2.ANALISIS DE ECP.....	104
I.5.2.1.Recogida de sangre y separación de suero....	104
I.5.2.2.Determinación de ECP.....	105
III.6.SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES.....	106
III.7.ESTUDIO DE SENSIBILIDAD-ESPECIFICIDAD.....	111
III.8.ANALISIS ESTADISTICOS.....	112
IV.RESULTADOS.....	113
IV.1.DATOS DE LA PRIMERA REVISION.....	114
IV.1.1.RESULTADOS DE PRUEBAS FUNCIONALES- PROVOCACION CON METACOLINA.....	114
IV.1.2.SITUACION CLINICA.....	115
IV.1.3.CELULARIDAD EN SANGRE.....	115
IV.1.4.SITUACION DE ATOPIA.....	116
IV.1.5.NIVELES DE ECP.....	117
IV.1.5.1.Población control-pacientes.....	117
IV.1.5.2.Distribución por edad.....	117
IV.1.5.3.Según gravedad clínica(AAS Score).....	117
IV.1.5.4.Según gravedad clínica (Consenso Internacional).....	118
IV.1.5.5.Según sensibilidad alérgica.....	118
IV.1.5.6.Relación con parámetros funcionales y PD20.....	118
I.5.1.7.Relación con el número de eosinófilos.....	119
IV.2.DATOS EVOLUTIVOS CLINICOS, FUNCIONALES Y ANALITICOS EN CADA GRUPO SEGUN TRATAMIENTO.....	120
IV.2.1.EVOLUCION DE LOS PARAMETROS FUNCIONALES.....	120
IV.2.2.EVOLUCION CLINICA.....	120

IV.2.3.EVOLUCION DE LOS NIVELES DE ECP Y CIFRA DE EOSINOFILOS.....	121
IV.3.PREDICCION DE REAGUDIZACION CLINICA.....	123
IV.4.ESTUDIO DE SENSIBILIDAD-ESPECIFICIDAD- VALORES PREDICTIVOS DE LA PRUEBA.....	123
IV.5.NIVELES DE ECP SEGUN TEMPERATURA Y TIEMPODECONGELACION.....	124
TABLAS Y FIGURAS DE RESULTADOS.....	125
TABLAS N° 9 A N° 21.....	126
FIGURAS N° 3 A N° 9.....	139
V.DISCUSION.....	146
V.1.DISCUSION.PLANTEAMIENTOGENERAL.....	147
V.2.DISCUSION DEL METODO.....	153
V.3.DISCUSION DE LOS RESULTADOS.....	159
VI.CONCLUSIONES.....	171
VII.RESUMEN.....	174
VIII.BIBLIOGRAFIA.....	179

INTRODUCCION

I.1. ASMA BRONQUIAL; DEFINICIONES.

La definición de asma surgida del Symposium Ciba de 1959¹, no difería mucho de la descripción hecha por Floyer en el siglo XVII, que especificaba los rasgos característicos del asma, más en términos cualitativos que cuantitativos. En esta definición se aludía al "estado de las personas con estrechamiento difuso de las vías aéreas bronquiales, cuya intensidad varía durante cortos periodos de tiempo, bien espontáneamente o bajo tratamiento, y no se debe a enfermedad cardiovascular".

Con posterioridad (1963), la American Thoracic Society (ATS)² introdujo una condición adicional que establecía como característica del asma una "reactividad aumentada de las vías aéreas".

En el siguiente Symposium Ciba de 1971³, se recomendaba una amplia descripción de los pacientes siempre que se dieran informes de estudios, como reflejo de la incapacidad para llegar a una definición operativa de asma.

Así pues, ninguna de estas definiciones satisfacían plenamente las necesidades de los clínicos e investigadores de identificar y delimitar como asmáticos o no a los distintos grupos de pacientes con obstrucción de las vías aéreas.

Las condiciones de obstrucción de las vías aéreas y reversibilidad de la misma, establecidas en las anteriores definiciones como principios para incluir a un paciente en uno u otro grupo, se muestran claramente insuficientes al enfrentarlos con el diagnóstico establecido sobre bases clínicas. Así, es conocido como algunos pacientes etiquetados de "asmáticos" presentan poca reversibilidad de la obstrucción de

las vías aéreas (en particular los que presentan asma "crónico" o en estadios más graves de su evolución) y, por el contrario, pacientes etiquetados de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), presentan durante las fases de reagudización de su patología hiperreactividad bronquial y no desdeñable reversibilidad en esa obstrucción.

Independientemente de la hipótesis formulada por Orié y cols^{4,5} (denominada hipótesis holandesa), que indica que el asma y la obstrucción crónica de las vías aéreas son dos aspectos del mismo proceso básico, y que los pacientes participan de una constitución alérgica común y tienen hiperreactividad bronquial, los hechos formulados anteriormente podrían ser contradictorios según las definiciones expuestas por la ATS y Ciba.

Así pues, parecía que para el diagnóstico de asma eran necesarios varios factores: en algunos pacientes la aparición de episodios cortos de obstrucción grave, pero reversibles, de las vías respiratorias, a menudo asociada a desencadenantes alérgicos conocidos; en otros, con síntomas más crónicos, la inesperada respuesta a fármacos como los corticosteroides o el cromoglicato, lo cual infería un componente "asmático". En este sentido, hasta hace poco tiempo, la respuesta clínica a estos fármacos ha sido la evidencia más importante de que en el asma subyacen fenómenos inflamatorios específicos bronquiales.

Al incrementar nuestros conocimientos sobre esta patología se han ido erigiendo modelos más complejos, en los que destacan dos aspectos esenciales: la hiperreactividad bronquial y la inflamación de las vías aéreas⁶.

El uso de técnicas complementarias para el estudio de las

enfermedades respiratorias (como la fibrobroncoscopia (FB), con el análisis de muestras de biopsias bronquiales y líquidos de lavado broncoalveolar (BAL)), ha puesto de manifiesto no sólo la existencia de la inflamación, sino que ha permitido la investigación directa de los componentes celulares implicados y sus interrelaciones.

Por otro lado, al ser sistematizada la medición de la reactividad bronquial a histamina o metacolina, se ha podido cuantificar y establecer comparaciones entre individuos, situaciones clínicas y respuestas al tratamiento.

Teniendo en cuenta los múltiples estudios efectuados que indican la importancia de la inflamación en la patogénesis del asma, se definió en el último Consenso Internacional sobre el diagnóstico y tratamiento del asma⁷ a ésta como "enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas en la que intervienen múltiples células, incluyendo mastocitos y eosinófilos. En individuos susceptibles esta inflamación causa síntomas, que están usualmente asociados con obstrucción difusa, pero variable, de las vías aéreas, frecuentemente reversible de forma espontánea o con tratamiento, y provoca aumento de la respuesta de las vías aéreas a variados estímulos".

Sin embargo, y aún cuando se consideren hoy en día de importancia crucial los fenómenos inflamatorios, ello no es óbice para que existan otra serie de mecanismos implicados y conectados, con el hecho de la inflamación, como son la respuesta contráctil de la musculatura lisa de la vía aérea^{8,9,10}, los factores neurogénicos¹¹⁻¹⁵ o la importancia de los canales iónicos calcio-dependientes¹⁶, Sodio-Potasio¹⁷, ect.

I.2. RESPUESTA ASMÁTICA PRECOZ (RAP) y RESPUESTA ASMÁTICA TARDIA (RAT).

La respuesta asmática precoz (RAP), comienza a los pocos minutos (10-20) de la exposición o estimulación antigénica y se caracteriza por la obstrucción de las vías respiratorias, que suele resolverse de forma espontánea a los 60-90 minutos, o tras la inhalación de agonistas β_2 . Es similar a la reacción de habón y eritema descrita en la piel para los tests cutáneos¹⁸. En la RAP, además de broncoespasmo, hay aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación y edema de la pared bronquial^{19,20}.

En los estudios realizados en biopsias bronquiales y BAL de asmáticos, se implica de forma muy directa al mastocito y sus productos como los principales responsables de esta fase. El basófilo parece quedar excluido, ya que, el albuterol y el cromoglicato sódico, conocidos inhibidores tanto de la función mastocitaria como de la RAP, no actúan sobre los basófilos^{21,22}.

El proceso que inicia la cascada de acontecimientos que tienen lugar en la RAP sería el siguiente: tras un primer contacto con el antígeno, el individuo atópico reacciona produciendo IgE. Esta inmunoglobulina a través de su fragmento Fc se une a los receptores de alta afinidad (Fc ϵ RI) localizados en las membranas celulares de mastocitos y basófilos, y a los de baja afinidad (Fc ϵ RII), situados en las membranas de macrófagos, monocitos, eosinófilos, plaquetas y linfocitos B²³⁻²⁷. El sujeto queda así sensibilizado para un segundo encuentro con el alérgeno, en el que se forma un enlace cruzado con los componentes Fab de las moléculas IgE adyacentes en la superficie del mastocito. La subsiguiente aproximación de los respectivos receptores con el

Fc de la IgE, estimula una serie de procesos de membrana y citoplasmáticos que culmina con la liberación de mediadores preformados y la producción y liberación de productos de nueva síntesis²⁸.

Así, la célula mastocitaria¹⁹ se activa y comienza la degranulación de forma inmediata tras el nuevo contacto con el antígeno, liberando los mediadores preformados y otros de nueva síntesis que posteriormente evaluaremos más extensamente.

La respuesta asmática tardía (RAT) comienza alrededor de las 3 ó 4 horas de la exposición al antígeno, alcanza su máxima expresión a las 4 u 8 horas, persistiendo durante al menos 12 horas^{18,20}. Clínicamente se manifiesta por la aparición de un nuevo broncoespasmo más persistente y que sólo cede parcialmente con agonistas β_2 . Esta fase puede ser abolida con esteroides y cromoglicato sódico, si son inhalados previamente al contacto con el antígeno²⁹. Las células que participan de forma más destacada en esta fase son el eosinófilo y el linfocito, aunque también intervienen otras células como los neutrófilos y células plasmáticas¹⁹.

Posteriormente evaluaremos de forma detallada cada uno de los mediadores implicados en esta fase y sus acciones concretas.

I.3. INFLAMACION. DEFINICION. ASPECTOS GENERALES.

La inflamación puede definirse, de una forma elemental, como una forma de respuesta del tejido vascularizado a cualquier tipo de agresión, que sirve para resolver y reparar (o al menos lo intenta), el efecto del daño.

Aunque esta definición pueda parecer simple, lleva implícita la participación de gran cantidad de factores iniciadores, múltiples células y mediadores liberados por ellas, con interrelaciones complejas y variadas, que en muchos casos se escapan a la propia investigación médica.

Así, como factores generales que inician la inflamación y que lesionan a la célula, podemos incluir: agentes infecciosos (bacterias, virus y parásitos), físicos (quemaduras, radiaciones y traumatismos), químicos (medicamentos, toxinas y agentes industriales), lesiones isquémicas de los tejidos y reacciones inmunológicas de alergia y autoinmunidad.

Las características histopatológicas generales de la inflamación incluyen: alteraciones del flujo sanguíneo vascular y del calibre de los pequeños vasos sanguíneos, seguidos de alteraciones de la permeabilidad vascular, y una serie de modificaciones que implican a los leucocitos.

La inflamación aguda es de corta duración y se caracteriza por exudación de líquido con proteínas de plasma (edema) y migración leucocitaria, fundamentalmente de granulocitos. La inflamación crónica es de larga duración, generalmente con migración granulocítica, pero también con densa infiltración de linfocitos y monocitos/macrófagos, a la vez que hay proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo. Tanto la inflamación aguda como

la crónica van asociadas, en cierto grado, al depósito de fibrina con adherencia plaquetaria y liberación de sus productos.

Los basófilos son también células inflamatorias importantes en determinadas formas de hipersensibilidad de tipo retardado, encontrándose, asimismo, en las vías respiratorias altas de pacientes con rinitis alérgica. Sin embargo, no existen evidencias concluyentes de su participación en procesos patológicos pulmonares.

Así pues, las células que migran desde los vasos sanguíneos e identificadas en la inflamación de las vías aéreas comprenden neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos. Las plaquetas pueden contribuir a la reacción, pero sigue en controversia hasta qué punto pueden emigrar de forma activa desde la sangre. Algunas células presentes en los tejidos, como los mastocitos y las células epiteliales, probablemente también participen, así como los fibroblastos que intervienen en los procesos reparativos inherentes a toda inflamación mantenida.

Por último, la inflamación de las superficies mucosas tiene dos características adicionales destacables: descamación o denudación de la superficie epitelial de las vías aéreas e hipersecreción de moco³⁰.

I.4. INFLAMACION Y RESPUESTA ALERGICA.

Enfermedades atópicas como la rinitis alérgica, el asma y la dermatitis atópica constituyen trastornos inflamatorios crónicos que se caracterizan por presentar en su evolución reagudizaciones y remisiones, y asociarse con la exposición alérgica.

La idea tradicional ha sido que, tras la activación de los mastocitos, se produce la liberación de una serie de sustancias preformadas y rápidamente sintetizadas, que median en la aparición inmediata de la vasodilatación, la extravasación vascular, la contracción del músculo liso y la estimulación de los receptores nerviosos irritantes. Sin embargo, estos mediadores se degradan rápidamente, y se cree que no están asociados a un componente inflamatorio crónico mantenido significativo (característica esencial de estas patologías).

En los últimos años se ha establecido que la interacción del alérgeno con el sistema inmune es, de hecho, mucho más compleja. Además de la activación de los mastocitos, el alérgeno puede interaccionar con los linfocitos T y el sistema mononuclear fagocitario y activarlos, dando lugar a la secreción de citoquinas y otras sustancias inflamatorias. Además, la interacción del alérgeno con los mastocitos puede ser mucho más compleja, con la posibilidad de estimular la liberación tardía de citoquinas sintetizadas "de novo". Esta interacción puede provocar también la liberación secundaria de neuropéptidos inflamatorios.

Por este motivo, el espectro conocido de mediadores liberados tras la exposición al alérgeno se ha ampliado de forma muy notable en los últimos años. Estos incluyen numerosos péptidos

quimiotácticos y de activación, algunos de ellos todavía no bien caracterizados, como los eicosanoides y el factor activador plaquetario; varias proteasas, neuropéptidos y, de forma destacada, las citoquinas. Estos mediadores reclutan y activan neutrófilos, monocitos, basófilos y eosinófilos, atraen a otros linfocitos y células fagocitarias mononucleares e inducen la proliferación de mastocitos y su posterior degranulación, en un círculo vicioso que da lugar a una mayor inflamación y destrucción tisular. Por este motivo la interacción del alérgeno con el sistema inmunitario se convierte en una cascada compleja de reacciones capaces de producir los cambios inflamatorios crónicos característicos de los trastornos alérgicos³¹.

I.5. INFLAMACION DE LA VIA AEREA EN OTRAS ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.

La inflamación bronquial no es característica exclusiva de la enfermedad asmática. Existen otras patologías respiratorias, donde es también un hecho importante. Así, en estudios de biopsias bronquiales en pacientes con EPOC se ha podido constatar que la inflamación crónica de la pared de la vía aérea es una característica destacable³²; en pacientes con Fibrosis Quística (FQ), las vías aéreas están también crónicamente inflamadas pero, al contrario que en el asma y EPOC, las células inflamatorias en la FQ están presentes sobre todo en la luz de la vía aérea, más que en la pared o el epitelio de la misma³³.

Así pues, aunque el fenómeno inflamatorio puede ser característica común de diversas patologías respiratorias, es igualmente posible establecer caracteres distintivos en las diferentes entidades en que está presente. Se han podido demostrar, así, diferencias tanto en los perfiles celulares, como en la localización de estas células participantes en la reacción inflamatoria.

En este sentido, de forma general, se puede indicar que en el asma parecen predominar los eosinófilos, linfocitos y mastocitos, mientras que en la EPOC y FQ son más importantes los polimorfonucleares neutrófilos (PMN). Estas diferencias pueden estar en relación con la incidencia y características de la Hiperreactividad bronquial de estas enfermedades³⁴.

I.6. LA INFLAMACION EN EL ASMA.

I.6.1.EVIDENCIAS ANATOMOPATOLOGICAS.

Desde hace años se han descrito los cambios que se producían en los tejidos de pacientes fallecidos en status asmáticos. El advenimiento de la fibrobroncoscopia y su utilización de forma generalizada con escasa morbilidad, hizo posible el estudio de biopsias bronquiales de pacientes con distinta severidad clínica de asma. El avance en la interpretación y evaluación de muestras de lavado broncoalveolar (BAL) nos permitió el análisis de las células y los mediadores que posiblemente estén implicados en la inflamación.

I.6.1.1.Estudios de necropsias.

En las muertes por asma hay algunas características anatomopatológicas clásicas que parecen ser típicas y que incluyen: intensa infiltración de eosinófilos y depósito de productos de los eosinófilos en y alrededor del epitelio bronquial³⁵. Es común también la existencia de un gran número de linfocitos y macrófagos y, habitualmente, se encuentran neutrófilos. Hay marcada hiperemia y dilatación de los vasos sanguíneos, así como considerable hipersecreción de moco con tapones mucosos en las pequeñas vías. Junto a esto se encuentra engrosamiento de la membrana basal e hiperplasia de células caliciformes. En estas descripciones patológicas es manifiesta la hiperplasia del músculo liso^{35,36}.

En un estudio más reciente, Kleinerman y Adelson³⁷, examinaron 39 necropsias de casos registrados como asma bronquial. Se seleccionó un número similar de muertes, como casos-control, que

sucedieron durante el mismo periodo, apareados por edad, sexo y raza. Los análisis finales indicaron que los criterios más útiles, desde el punto de vista histológico, para el diagnóstico de asma eran: la infiltración de las paredes bronquiales por eosinófilos, la hipertrofia muscular bronquial y bronquiolar y el engrosamiento de la membrana basal, que aparecieron significativamente más a menudo en los asmáticos que en los controles.

En distintos estudios necrópsicos se muestra como denominador común el hallazgo de eosinófilos en la submucosa bronquial de pacientes fallecidos por ataques asmáticos³⁸⁻⁴¹, aunque este hallazgo no es constante en otros^{42,43}.

I.6.1.2. Biopsias bronquiales.

En estudios de biopsias bronquiales obtenidas por FB se han descrito diferencias entre los casos clínicos de asma leve o grave. Laitinen y cols⁴⁴, describieron (en muestras de vías aéreas de pacientes asmáticos con hiperreactividad bronquial), la destrucción del epitelio bronquial, el edema de la mucosa y una población celular inflamatoria. En otro estudio⁴⁵ se examinaron las biopsias bronquiales de 10 pacientes con asma leve o grave, estabilizados clínicamente en el momento de la biopsia. Utilizaron como controles fumadores inveterados, incluyendo algunos con síntomas compatibles con bronquitis crónica, y pacientes con síndrome de hiperventilación.

En estos controles la mucosa de la vía aérea tenía una apariencia firme; el epitelio se veía "apretado" y las células ciliadas y caliciformes estaban firmemente adosadas entre sí por uniones

íntimas contiguas a la luz de la vía aérea. Se apoyaban sobre la membrana basal, paralelamente a las células basales. En la mayoría de las muestras el epitelio tenía una estructura normal con células ciliadas, caliciformes y basales. El número de otras células en el epitelio y la lámina propia era escaso.

En los asmáticos el cuadro histológico era muy diferente y fue imposible encontrar un área de epitelio bronquial totalmente normal. De forma frecuente se apreciaban vías aéreas donde sólo las células basales estaban apoyadas sobre la membrana basal. En la mayor parte de los casos se veía epitelio, pero de apariencia "frágil". En áreas menos dañadas, en los espacios intercelulares y en la base del epitelio, se había acumulado un material homogéneo, probablemente líquido edematoso. En casos extremos, este material parecía separar las columnas de células epiteliales de la membrana basal y de las células basales. Esta impresión, de células "empujadas" hacia fuera de la membrana basal, se veía a menudo adyacente a los focos de destrucción epitelial, donde sólo las células basales estaban presentes, o la membrana basal estaba denudada.

El aspecto frágil del epitelio asmático aparece, en parte, como consecuencia de las alteraciones en las células. Las células ciliadas, especialmente, parecen estar hinchadas, vacuolizadas y a menudo muestran pérdida de cilios. La membrana basal está generalmente, pero no siempre, engrosada y el epitelio y la lámina propia muestran acúmulos de distintas células inflamatorias.

Los asmáticos presentaban grandes variaciones individuales en el número de mastocitos, eosinófilos y neutrófilos intraepiteliales,

pero también había algunas características comunes: todos tenían un cierto grado de lesión epitelial, con mastocitos en el epitelio que, en todos los casos, estaban degranulados generalmente de manera intensa.

En estudios más recientes de biopsias de asmáticos se ha apreciado el incremento de la cantidad de macrófagos, linfocitos^{46,47} (sobre todo células tipo Th2⁴⁸, que como después veremos expresan ARNm para las interleucinas IL3,4,5 y factor estimulante de las colonias de granulocitos macrófagos GM-CSF) y mastocitos⁴⁹, así como de eosinófilos, que difieren en número según la distinta severidad del asma evaluada. En este sentido, se han observado eosinófilos en el asma leve y moderada que aumentan en número notablemente durante las reagudizaciones sintomáticas. Sin embargo, en pacientes con asma de gran duración o gravedad establecida mayor, la presencia de estas células, de forma curiosa, es menos marcada, pudiendo estar reemplazadas por los neutrófilos. Se ha indicado, pues, que el asma crónica con alteraciones de la función pulmonar puede asociarse con la afluencia de neutrófilos⁵⁰.

Recientemente el grupo de Bousquet⁵¹, encuentra correlación positiva entre el número de eosinófilos presentes en el epitelio bronquial y la severidad clínica del asma, aunque en su estudio no se evalúan pacientes con el grado máximo de severidad (grado 5 según los niveles de Aas⁵²). En este mismo trabajo se demuestra la existencia de un número incrementado de eosinófilos en la submucosa bronquial.

Por último hay que subrayar (como indica el propio Bousquet en un trabajo posterior⁵³) que el análisis de biopsias bronquiales

extraídas mediante FB, no parece el método más adecuado para establecer la magnitud de la inflamación en el asma, por la propia heterogeneidad de las lesiones en esta patología, la alteración de las muestras que se produce por la propia técnica en sí, ect.

I.6.1.3. Estudios en Lavado Broncoalveolar (BAL).

Indicado lo anterior, parecen más adecuadas las muestras obtenidas por BAL para la investigación de la inflamación en el asma y su cuantificación.

La existencia de células inflamatorias en líquido de BAL obtenido de asmáticos se ha descrito en múltiples estudios. De entre ellas, se ha demostrado que los eosinófilos aparecen en la mayor parte de los asmáticos^{54,55}.

Wardlaw y cols⁵⁶ encontraron que en pacientes con asma atópica leve, el porcentaje de mastocitos aumentaba de 5 a 6 veces sobre los valores control. En este mismo trabajo se demostró que la media de los recuentos de eosinófilos en un grupo de asmáticos paucisintomáticos, con hiperreactividad de las vías aéreas, era significativamente más elevada que la de un grupo de asmáticos no sintomáticos, de otro grupo de pacientes con fiebre del heno y de un último constituido por voluntarios sanos (aunque hay que destacar que la causa de estas diferencias eran 2 ó 3 asmáticos sintomáticos).

Kelly y cols⁵⁷ comunicaron el incremento de la cantidad de eosinófilos y linfocitos en BAL de pacientes con asma estable, comparados con los controles. El número de macrófagos estaba aumentado sólomente en los fumadores, pero no había diferencias

entre los pacientes y los controles.

Otros grupos han indicado la existencia de un aumento en el número de mastocitos, y de la cantidad de histamina, en el BAL de asmáticos crónicos estables, lo que podría ser un indicador de la activación progresiva de los mismos⁵⁸.

En un estudio de Adelroth y cols⁵⁹ se indican, asimismo, diferencias significativas en el número de eosinófilos y células epiteliales en BAL en relación con un grupo control de sanos y, en otro trabajo del grupo de Bousquet⁶⁰, se describe (al comparar líquidos de BAL de asmáticos y normales), mayor cantidad de neutrófilos, linfocitos, células epiteliales y eosinófilos en los asmáticos y mayor número de macrófagos en los normales.

Sin embargo, las diferencias mayores (significativas estadísticamente) se dieron en el caso del incremento de los eosinófilos en asmáticos. Este mismo autor encuentra una correlación significativa entre los niveles de eosinófilos en BAL y la severidad clínica del asma⁶¹.

Pero, no sólo se han estudiado en BAL los diferentes tipos y cantidad de células presentes en la vía aérea; el estudio más reciente de los distintos mediadores de la inflamación, liberados por ellas, ha aportado información importante en la investigación de las circunstancias que intervienen en la iniciación y mantenimiento de la inflamación en el asma, así como en la responsabilidad de las lesiones histológicas ya comentadas.

Cabe destacar, en este sentido, los múltiples estudios realizados en BAL, sobre todo de los niveles de proteína básica mayor (PBM) y de proteína catiónica del eosinófilo (ECP), que revisaremos con posterioridad.

I.6.2.CELULAS PARTICIPANTES.

Las células participantes en la inflamación son variadas. En este capítulo haremos una revisión, que ha de ser necesariamente somera, de cada una de las células implicadas, centrándonos sobre todo en su posible participación concreta en la inflamación asmática y en sus interrelaciones. Al final, en capítulo aparte, revisaremos de forma más detallada la estructura y mediadores liberados por el eosinófilo, su importancia en la inflamación y la respuesta al tratamiento esteroideo.

I.6.2.1 Mastocitos y Basófilos.

En el hombre los mastocitos se localizan en la luz de las vías aéreas (de donde pueden obtenerse por BAL), en el epitelio bronquial, en la submucosa, y también en el parénquima pulmonar. Los basófilos no han sido indentificados en la enfermedad bronquial o en cualquier situación asociada con hiperreactividad, aunque probablemente estén presentes, como lo están en la mayoría de órganos. Los datos actuales sugieren que la reacción asmática precoz está mediada por los mastocitos predominantemente³⁰. A los pocos minutos de la agresión antigénica en personas atópicas se ha demostrado elevación de la histamina en plasma y en BAL^{56,61,62}. En las siguientes horas se observó una secreción urinaria aumentada de N-metilhistamina, un catabolito principal⁶³. Así pues, la respuesta inmediata a alergenitos inhalados en sujetos atópicos, como se indicó, es rápida en su comienzo y fácilmente reversible por agonistas β_2 adrenérgicos inhalados y por el cromoglicato sódico²¹. Los corticoides administrados durante algún tiempo, también atenúan la reacción inmediata, posiblemente

por deplección de mastocitos de la mucosa⁶⁴. Además de la histamina, los mastocitos pulmonares humanos también elaboran leucotrienos, prostaglandinas, factor agregante plaquetario (PAF), varios péptidos quimiotácticos, enzimas proteolíticas (triptasa) y proteoglicanos, muchos de ellos de papel fisiopatológico en estudio actual. Además, la activación mastocitaria, como mecanismo patogenético de la broncoconstricción inmediata, no se limita a la exposición al alérgeno, existiendo evidencias de que también puede participar en el asma inducida por el ejercicio, por aire frío y por hiperventilación⁶⁵.

Por otro lado, se ha especulado sobre el papel que podrían ejercer los mastocitos en las reacciones de fase tardía y en la evolución continua del asma crónico. A finales de los años 70 se demostró que el F(ab')₂ anti-IgE, cuando se inyectaba en la piel producía una reacción retardada, que tenía muchas de las características histopatológicas de una reacción igual inducida por alérgenos. Por ello se planteó la hipótesis de que los mastocitos eran importantes en las reacciones tardías y que los factores quimiotácticos derivados de los mastocitos explicaban la subsiguiente infiltración de eosinófilos, neutrófilos y basófilos. Sin embargo, en la actualidad se han acumulado evidencias de que la reacción de fase tardía está asociada con la presencia de eosinófilos^{66,67} y linfocitos sobre todo⁶⁸, aunque existan otros trabajos que sigan implicando a la célula mastocitaria. En este sentido, Crimi y cols⁶⁹, tras realizar a pacientes asmáticos una prueba de provocación alérgica, encuentra, a las 24 horas de la misma, un número elevado de

mastocitos en la mucosa bronquial de los pacientes que desarrollaron una respuesta tardía, en relación a los que no. En conclusión, si bien es posible que la célula mastocitaria haya perdido parte de su anterior clásica posición de primacía en el asma, no es menos cierto que su intervención en la fisiopatología del asma sigue siendo considerada notable, sobre todo en el asma inducida por ejercicio y antígeno⁷⁰. Sin embargo es, cuanto menos, discutible que los mastocitos intervengan en la reacción de fase tardía, existiendo aún poca certidumbre en favor o en contra de que estas células tengan una acción esencial en la evolución continua del asma crónico.

I.6.2.2. Monocitos y macrófagos (fagocitos mononucleares).

La mayor parte de las células recogidas en el BAL, tanto en pacientes asmáticos como en personas normales, son macrófagos. Estas células contienen receptores funcionales IgE(FcεR2)^{23,24}, siendo el número de las que contienen IgE sustancialmente mayor en los asmáticos atópicos que en los controles normales⁷¹. Los macrófagos pueden producir una amplia gama de mediadores lipídicos que incluyen eicosanoides (por las vías lipo y ciclooxigenasa), así como PAF. También los fagocitos mononucleares fabrican y segregan gran variedad de proteínas y péptidos provistos de actividades biológicas, que pueden contribuir a las reacciones de las vías aéreas. En el BAL se constató que tras la prueba de provocación alérgica hay un incremento sustancial del número de macrófagos⁷². Este aumento parece deberse a la migración de monocitos al interior del pulmón (se obtienen células peroxidasa positiva, aspecto característico

de los monocitos al compararlos con los macrófagos alveolares). Estos mismos hallazgos se han obtenido últimamente en muestras de biopsias bronquiales de pacientes asmáticos, siendo destacable la presencia incrementada de macrófagos con aspecto fenotípico de monocitos hemáticos⁴⁶.

En las reacciones de fase tardía también son activados los macrófagos pulmonares, demostrados por el aumento de rosetas de complemento.

Recientemente se ha indicado que la activación del macrófago alveolar acontece inmediatamente después de la provocación antigénica, y que la respuesta tardía está caracterizada por la aparición de macrófagos de alta densidad que potencian la liberación de aniones superóxidos⁷³.

Por otro lado, los asmáticos crónicos graves relativamente refractarios al tratamiento con corticoides, tienen un número aumentado de monocitos circulantes activados⁷⁴.

Lo anterior proporciona un apoyo circunstancial al papel de los fagocitos mononucleares en la patogénesis del asma. Así, histológicamente, las lesiones inflamatorias del asma contienen fagocitos mononucleares, lo que hace presumir su participación en el proceso, pero también es necesario indicar el papel que desempeñan las series de células monocitarias fagocíticas en las resoluciones de la inflamación⁷⁵. Por tanto, no está totalmente aclarado si estas células participan activamente en la fisiopatología del asma, o actúan modulando los efectos que producen otras células y mediadores. Dada la existencia de fenotipos funcionales diferentes de células macrofágicas, es posible que coexistan en las vías aéreas de los asmáticos

macrófagos que contribuyan al desarrollo del asma y otras que limiten la extensión de la inflamación en esta enfermedad.

I.6.2.3. Neutrófilos.

Los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) pueden jugar un papel destacado en la fisiopatología del asma. Sin embargo existe controversia en cuanto a la evidencia de que estas células, por sí mismas, desarrollen un papel importante en la hiperreactividad bronquial asociada a la progresión clínica del asma.

Por un lado, algunos estudios en animales de experimentación y de modelos control de asma en el hombre, indican que los neutrófilos pueden desempeñar un determinado papel en el estadio precoz del proceso asmático. Sin embargo, estas células pueden encontrarse en las grandes vías aéreas, tanto de sujetos hiperreactivos como normorreactivos. Así, Wardlaw y cols.⁵⁶, encontraron gran porcentaje de neutrófilos en el lavado bronquial (broncoaspirado) de controles no-atópicos, en pacientes con fiebre del heno, y en asmáticos leves. Estas cifras fueron similares en todos los grupos y considerablemente mayores que las observadas en el líquido de BAL, alcanzando casi el 50% del total de células contadas en los lavados bronquiales de sujetos normales. Es, pues, necesario establecer qué diferente grado de activación o estimulación muestran los neutrófilos en los asmáticos comparados con los de los sujetos normales.

En este sentido, se ha apuntado que los neutrófilos de sangre periférica se hacen activos tras las respuestas asmáticas precoces o de fase tardía inducidas por alergenos o por

ejercicio^{76,77}. La activación se valoró por la aparición de un aumento en la membrana de receptores del complemento, y de una citotoxicidad incrementada para células diana recubiertas de complemento.

Además, se ha observado un incremento significativo del porcentaje de neutrófilos en el BAL y en el moco bronquial de sujetos que experimentaron reacciones de fase tardía tras la agresión bronquial. Este incremento puede ser inhibido con la administración previa de prednisona⁷⁸.

Sin embargo, en un reciente trabajo, se ha demostrado una proporción significativamente mayor de PMN en BAL de pacientes con asma corticodependiente intratable (ACDI), en relación con los no-ACDI (la proporción de linfocitos, por el contrario fue menor)⁷⁹, sugiriéndose que el tratamiento corticoideo prolongado aumenta el número de neutrófilos en las vías aéreas (a la vez que disminuye el de linfocitos)^{80,81}.

En otro estudio se llega a la conclusión de que la infiltración neutrofílica es la principal característica de la inflamación de la mucosa respiratoria, en pacientes con asma bronquial con agudización grave de inicio agudo que causa la muerte en poco tiempo⁸².

Así pues, el acúmulo de neutrófilos en las vías aéreas durante la inflamación, tiene el potencial de producir lesiones tisulares significantes. Es fuente de gran variedad de mediadores lipídicos (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, PAF, proteasas, materiales catiónicos, metabolitos de oxígeno, ect).

De todas formas, permanece aún abierto en qué medida participan los neutrófilos en las alteraciones funcionales propias del asma.

La frecuente obtención de neutrófilos en BAL de pacientes asmáticos, la presencia en los cortes de tejidos de las vías aéreas, la liberación de mediadores producidos por ellos y su capacidad de lesión tisular, alterando esta funcionalidad son argumentos a favor de esta participación.

I.6.2.4.Linfocitos.

La participación de estas células en el asma bronquial ha sido señalada desde hace bastantes años. Así, el examen postmortem de las vías aéreas de enfermos asmáticos ha mostrado la existencia de gran cantidad de linfocitos³⁵ y, en estudios de morfología ultraestructural de biopsias bronquiales obtenidas en vida de sujetos afectados de asma leve, se encontró un número aumentado de "linfocitos atípicos intraepiteliales"³³.

Sin embargo, pese a que estos conocimientos no sean recientes, sigue siendo un área de gran interés actual el estudio de las funciones que tienen los linfocitos en la regulación y expresión de la inflamación asociada al asma.

En este sentido, es probable que los linfocitos jueguen un papel en todas las reacciones inflamatorias producidas por antígenos, dado que son las únicas células que, a través del complejo receptor antígeno/CD3, reconocen y responden de manera directa ante los antígenos procesados. Los linfocitos T activados a través de la liberación de linfoquinas, muestran la capacidad de controlar la cantidad y naturaleza de las reacciones inflamatorias. Cada vez se dispone de más evidencias, según las cuales, los linfocitos T CD4 participan en la reacción inflamatoria observada en la mucosa bronquial asmática mediante

la secreción de linfoquinas que atraen y activan a los eosinófilos y mastocitos^{84,85,86}. Así, en el asma atópica, las muestras de biopsia bronquial y el fluido de BAL, presentan linfocitos T Helper (CD4), habiéndose descrito patrones diferentes de secreción de citoquinas entre las clonas de estos linfocitos: el linfocito T helper tipo 1 humano (Th1) produce interleuquina-2 (IL2), interferon- γ (IFN- γ) y factor- β de necrosis tumoral (TNF- β), mientras que el linfocito helper tipo 2 (Th2) elabora IL-4 e IL-5. Otras citoquinas, como IL-3, IL-6, Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) o TNF- α , son producidas tanto por los linfocitos Th1 como por los Th2. Así pues, el primer grupo de linfocitos son responsables de las reacciones de hipersensibilidad retardada, y son citolíticos para las células autólogas presentadoras de antígeno, mientras que los TH2 parecen tener un papel esencial en el asma atópica^{48,87}.

Estos linfocitos inducen la proliferación de IgE por la vía de la IL-4^{87,88} y favorecen la proliferación, diferenciación y activación de los eosinófilos por la vía de la IL-5⁸⁷.

Se ha demostrado pues, tanto en sangre como en el BAL, una estrecha correlación entre la activación de la célula T, la eosinofilia y la gravedad del asma⁸⁹, así como el incremento de forma selectiva de los linfocitos T activados (en concreto del subgrupo Th2) en la mucosa bronquial⁸⁶.

Por último, los linfocitos CD4 pueden constituir un objetivo importante de la acción de los corticoides en el asma, al disminuir su estado de activación, lo cual, en el esquema patogénico indicado, llevaría a una anulación en la producción

de IL-5 y subsiguientemente al descenso del número y activación de los eosinófilos^{85,90}.

I.6.2.5. Plaquetas.

En conjunto, no hay evidencias de que las plaquetas tengan un papel esencial en el asma humano, ni de que estén directamente relacionadas con la Hiperreactividad bronquial. Sin embargo, parece altamente probable su participación en las reacciones inflamatorias de las vías aéreas, teniendo en cuenta que estas células pueden liberar abundantes moléculas y mediadores que contribuyen al proceso.

Así, los primeros experimentos en conejos y cobayas ya sugerían que la deplección de plaquetas prevenía las respuestas de las vías aéreas inducidas por el PAF⁹¹. Posteriormente se han encontrado plaquetas en el líquido de lavado tras la agresión alérgica⁹².

Averill y cols⁹³., estudiaron recientemente la activación y subsiguiente liberación de productos plaquetarios (factor plaquetario 4 y beta-tromboglobulina) en líquido de BAL de pacientes asmáticos, tras la provocación antigénica. Llegaron a la conclusión de que la activación plaquetaria en el pulmón es característica de la respuesta inflamatoria tardía tras la provocación antigénica. El papel de estas células puede ser importante, por tanto, en la inflamación alérgica asmática.

I.6.2.6.Células epiteliales.

El epitelio respiratorio constituye la primera línea de defensa contra el polvo transportado por el aire, los vapores, los gases y humos, jugando un papel vital en el mantenimiento de la homeostasis fisicoquímica. La pérdida de epitelio es un hallazgo invariable en las vías respiratorias de los asmáticos. Durante los ataques de asma, las células epiteliales se descaman y aparecen en el esputo como cuerpos Creola o espirales de Curschmann. Los exámenes post-mortem de los asmáticos muestran una descamación extensa de las células epiteliales y una grave inflamación epitelial. Incluso en individuos con asma estable es evidente la descamación epitelial de la vía aérea⁴⁴.

En la actualidad es, pues, evidente el importante papel de las células epiteliales en la defensa de las vías aéreas, y probablemente en los procesos inflamatorios, por su esencial localización en la interfase entre el ambiente externo y medio interno. Células inflamatorias, como los neutrófilos, eosinófilos, ect, deben migrar a través del epitelio para alcanzar el lumen de las vías aéreas.

Pero las células epiteliales no son sólo "espectadores" pasivos de los acontecimientos que tienen lugar en la inflamación asmática. Además, son capaces de generar determinados mediadores de la inflamación, como los productos del ácido araquidónico por la vía de la lipooxigenasa 15-Hidroxieicosatetranoico (15-HETE) y 8-15- di-HETE⁹⁴. Estos últimos productos, como después veremos, son quimiotácticos para los neutrófilos y los primeros estimulan la liberación de mediadores de los mastocitos⁹⁵ e inhiben la producción de Leucotrienos C4 en los eosinófilos humanos⁹⁶.

Recientemente, Campbell y cols.⁹⁷, ratificaron lo anterior, describiendo que las células epiteliales pueden liberar pequeñas cantidades tanto de Prostaglandina E2, 15-HETE, como de fibronectina (mediador involucrado en la reparación epitelial tras una lesión). Esta liberación, en el caso del 15-HETE y fibronectina, estaba incrementada en los paciente asmáticos en relación con los normales, aumentando aún más los niveles de los tres mediadores (PGE2, 15-HETE y fibronectina) tras su estimulación con ionóforo de calcio. Se muestra así la activación de estas células epiteliales y su posible papel en el asma.

En conclusión, estas células pueden intervenir en la patogenia del asma, no sólo pasivamente, sino además, aumentando la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios, y disminuyendo la síntesis de mediadores protectores, modulando las moléculas de adhesión celular (importantes en la determinación de la arquitectura epitelial), ó participando en la inmunorregulación de los tipos de células inflamatorias.

Es probable que todos estos factores operen juntos e interactúen para producir inicialmente cambios funcionales en el epitelio que a la larga comportan los cambios estructurales característicos del epitelio respiratorio de los asmáticos⁹⁸.

I.7. EL EOSINOFILO.

El granulocito eosinófilo fue observado por primera vez por Wharton Jones, en 1846, en preparaciones no teñidas de sangre periférica⁹⁹. Sin embargo, fue Paul Ehrlich en 1879 quien lo denominó como tal "eosinófilo", debido a la intensa tinción de sus gránulos por el colorante eosina¹⁰⁰. Desde entonces se ha constatado su presencia en afecciones tan dispares como infecciones parasitarias, enfermedades atópicas, otras enfermedades inflamatorias, neoplásicas e inmunodeficiencias. Existen múltiples evidencias que indican que el eosinófilo es una de las principales células implicadas en la inflamación del asma bronquial, demostrándose su participación fundamental en la respuesta de fase tardía a antígenos inhalados^{19,30,51,101-105}.

En los últimos años se han descrito detalladamente sus características morfológicas y funcionales. El conocimiento de las funciones biológicas de sus proteínas de membranas y granulares, y la disponibilidad de métodos sensibles para la determinación de la mayoría de estos componentes en los líquidos corporales, ha permitido sugerir el grado de participación de estas células en enfermedades como el asma y la rinitis.

I.7.1. PRODUCCION DE LOS EOSINOFILOS.

I.7.1.1. Eosinopoyesis.

Se acepta que en individuos adultos y en condiciones normales, los eosinófilos se producen en la médula ósea.

A partir de una célula progenitora hematopoyética pluripotencial, se diferencia la célula progenitora multipotencial mieloide, que a su vez da lugar a células de potencial restringido, (en nuestro

caso a la serie eosinofílica); las células progenitoras formadoras de colonias de eosinófilos o CFU-Eos. Por último éstas células dan paso a los precursores promielocíticos que finalmente terminan en eosinófilos maduros.

Los eosinófilos maduros de la médula ósea son considerados como células que no se dividen, por lo que constituyen una "reserva" antes de su liberación a la circulación periférica, y son morfológicamente indistinguibles de los eosinófilos de sangre periférica¹⁰⁶.

I.7.1.2. Factores estimulantes de colonias de eosinófilos (CSF).

Son glucoproteínas que regulan la proliferación y la diferenciación de las células hematopoyéticas cultivadas, incluidos los eosinófilos. Algunos CSF, como la Interleucina 3, son relativamente inespecíficos en cuanto a la línea celular que estimulan, mientras que otros son más específicos, como el CSF granulocito-macrófago (GM-CSF), que estimula fundamentalmente las colonias de granulocitos-macrófagos, pero que en determinadas circunstancias puede estimular también el crecimiento inicial de colonias de eosinófilos¹⁰⁷. En este sentido, este factor ha sido objeto de estudios recientes (mediante los modernos métodos de inmunohistoquímica), demostrándose incrementos de sus niveles en BAL, en la respuesta tardía tras provocación alérgica, y su correlación con niveles incrementados de eosinófilos¹⁰⁸. Se ha indicado así su importancia (junto a la IL-5), como regulador de la proliferación, de las funciones efectoras y de la propia supervivencia del eosinófilo en pacientes asmáticos^{109,110,111}. Así mismo, se ha demostrado su desaparición de las células

epiteliales tras tratamiento con corticoides¹¹².

I.7.2.CICLO VITAL-CINETICA.

El ciclo vital del eosinófilo se puede dividir en las fases medular, sanguínea e hística.

Si bien los eosinófilos son elementos formes de la circulación periférica, fundamentalmente son células residentes en los tejidos, existiendo una relación en el hombre de 100:1 entre eosinófilos hísticos y sanguíneos. Por ello, los eosinófilos presentes en la circulación periférica representan sólo una pequeña fracción del número total de eosinófilos del organismo¹¹³.

El eosinófilo tiende a residir en tejidos cuya superficie epitelial está expuesta al medio ambiente externo, no siendo conocidos los factores que gobiernan la distribución orgánica preferencial de los mismos, si bien se han formulado hipótesis que subrayan que los factores quimiotácticos de eosinófilos influyen en la infiltración hística en determinadas circunstancias.

En cuanto a la cinética, son pocos los estudios que se han realizado, sobre todo en condiciones normales, dada la escasez de eosinófilos circulantes.

Sin embargo, se ha estimado la vida media de estas células en los diferentes compartimentos, siendo de aproximadamente 4 días en médula ósea, de 8 a 18 horas en compartimento sanguíneo y de 2 a 5 días en el tisular^{106,114}.

Parece ser que la migración de los eosinófilos desde la sangre a los tejidos, se produce por marginación y posteriormente diapédesis a nivel de las uniones intercelulares

endoteliales^{106,114,115}.

En recientes estudios se ha destacado que el proceso inicial de la emigración de los eosinófilos, desde el compartimento vascular hasta el tejido pulmonar, depende de la adherencia de los eosinófilos al endotelio vascular. Este hecho está asociado a la expresión de las moléculas de adhesión endotelial en los eosinófilos y las células epiteliales¹¹⁶. La importancia de la molécula de adhesión intercelular 1(ICAM1) en este proceso se demostró inicialmente mediante modelos animales de asma alérgico¹¹⁷, y más recientemente en biopsias bronquiales de pacientes asmáticos (mediante anticuerpos monoclonales)^{118,119}, tanto en el epitelio bronquial como el endotelio (denominándose en este caso VCAM-1). Estas moléculas de adhesión se encuentran significativamente elevadas en asmáticos en relación a la población normal^{118,119}, señalándose en el reciente trabajo de Gosset y cols.¹¹⁹ este significativo incremento sólo en el asma alérgica. Se ha establecido, así, su papel en la inflamación de la vía aérea y la hiperreactividad bronquial y la posibilidad de su modulación a través de fármacos dirigidos contra ellas (aunque con resultados hasta ahora poco satisfactorios).

Los cambios en la permeabilidad vascular pueden afectar en gran medida a la capacidad de los eosinófilos para infiltrar tejidos y contribuir a la patogenia de algunos síndromes clínicos, como el angioedema asociado a eosinofilia. Los mediadores de los mastocitos, histamina, leucotrieno C4 y las quininas sintetizadas, tienen efectos potentes, asimismo, en la permeabilidad y facilitarán el movimiento celular que puede ser promovido por estímulos adicionales generando la quimiotaxis,

como después veremos.

En condiciones normales, tras penetrar en los tejidos parece que la mayoría de los eosinófilos regresan a la circulación.

Por último, para la destrucción de los eosinófilos, existen varios mecanismos que comprenden la eliminación de las células hacia las superficies respiratorias e intestinal, fagocitosis por macrófagos y lisis y desgranulación "in situ", con la consiguiente degeneración celular asociada^{106,115}.

I.7.3. ESTRUCTURA.

El eosinófilo maduro humano es una célula de 12 a 17 μ m de diámetro en frotis sanguíneos, núcleo bilobulado y forma circular u ovoide, aunque puede presentarse ocasionalmente con pseudópodos ("células medusa"), en sangre periférica, esputo, médula ósea y frotis nasal. Además, los eosinófilos se caracterizan por sus gránulos citoplasmáticos distintivos, que se tiñen con la eosina, y que están presentes en cantidad aproximada de 200 gránulos por célula¹¹⁴.

Los gránulos específicos distintivos o secundarios están formados por un núcleo denso y una matriz radiotransparente a los electrones. Las imágenes a gran aumento del núcleo muestran un entramado reticular cristalino; por tanto, el núcleo está formado quizá por una única sustancia. Se han descrito además los gránulos primarios que son redondos, uniformemente densos a los electrones y se observan de forma característica en promielocitos eosinofílicos. Otro tipo de gránulos pequeños descritos contienen fosfatasa ácida y arilsulfatasa¹⁰⁶.

Actualmente, la utilización de técnicas inmunohistoquímicas y de

gradientes de densidad sucrosa, para separar los gránulos según su contenido en proteínas¹²⁰, permite distinguir entre gránulos muy densos (que contienen las cuatro proteínas mayores que describiremos), y otras dos poblaciones de gránulos de menor densidad (sólo con dos tipos de proteínas).

I.7.4.CONSTITUYENTES CELULARES Y FUNCIONES.

Los constituyentes principales de los eosinófilos son receptores para inmunoglobulinas y complemento, situados en la superficie de la membrana celular, lisofosfolipasa presente en la membrana celular y toda la serie de proteínas localizadas en los gránulos. También hay otras muchas enzimas, entre las que se encuentran las que son capaces de sintetizar el factor activador de las plaquetas y de metabolizar el ácido araquidónico a leucotrieno C4.

I.7.4.1.Proteínas de la membrana.

-Receptores de inmunoglobulinas y del complemento.

Los eosinófilos poseen receptores para fragmentos de la IgG y C3¹²¹, y la presencia de estos receptores se ha relacionado con sus funciones efectoras sobre los parásitos y células. En individuos normales, el número de eosinófilos con receptores Fc IgG supone menos del 10% del total, mientras que en pacientes con eosinofilia se ha observado en algunos trabajos hasta un 20% (en otros no se han encontrado diferencias con los normales).

La proporción de eosinófilos con receptores para el complemento varía entre el 30% en individuos normales y el 40% en pacientes con infecciones parasitarias. La expresión de receptores C3b y

C4 en eosinófilos es potenciada por la exposición al factor quimiotáctico de eosinófilos de la anafilaxia (ECF-A).

Existen pruebas que indican que los eosinófilos también poseen receptores para la IgE y que esta inmunoglobulina media la destrucción de parásitos por los eosinófilos. Probablemente los eosinófilos cubiertos con IgE se degranulen tras su exposición a alérgenos, como se ha mostrado por la liberación de proteínas granulares. Aún no está claro, por último, si los eosinófilos poseen receptores IgM¹⁰⁶.

-Proteína cristalina de Charcot-Leyden (CLC) (lisofosfolipasa).

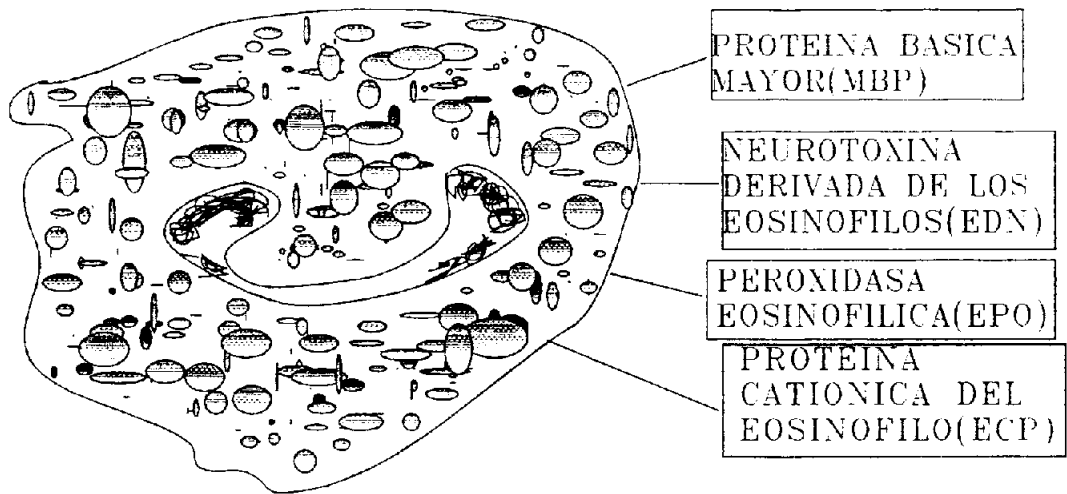
Esta proteína fue descrita por primera vez en 1853 en un paciente leucémico y, posteriormente, en 1872, en el esputo de pacientes con asma. Desde entonces, la presencia en los tejidos y líquidos corporales de estos cristales hexagonales bipiramidales se ha considerado una característica distintiva de los eosinófilos. Sin embargo, algunos trabajos aportan pruebas que indican que también se encuentran en los basófilos.

-Antígenos reconocidos por antisuero contra eosinófilos.

I.7.4.2. Proteínas granulares.

En los gránulos del eosinófilo (fig 1), podemos reconocer 4 proteínas mayores¹²²; tres localizadas en la matriz: Peroxidasa de los eosinófilos (EPO), Neurotoxina de los eosinófilos (EDN ó EPX), Proteína catiónica del eosinófilo (ECP); y una localizada en el núcleo: Proteína básica mayor (MBP). Estas proteínas son liberadas al medio extracelular in vitro tras la estimulación antigénica del eosinófilo. Revisaremos las características estructurales y funcionales de cada una de ellas, con especial referencia a la ECP, que estudiaremos en capítulo aparte.

FIGURA 1



EOSINOFILO

I.7.4.2.1. Proteína básica mayor (MBP):

Su denominación proviene de tener naturaleza proteica, su punto isoeléctrico a un pH superior a 11 y constituir aproximadamente el 55% del contenido proteico de los gránulos¹²³. Está formada por una cadena polipeptídica única de 117 residuos aminoácidos, es rica en arginina (alrededor del 16%) y tiene un peso molecular de unos 14.000.

Se localiza en el núcleo cristalóide de los gránulos secundarios del eosinófilo, siendo inmunohistoquímicamente idéntica a las proteínas del núcleo, por lo que se puede considerar todo el contenido proteico nuclear como MBP. Además, se ha localizado en las células X y células gigantes placentarias (los niveles séricos de MBP muestran un notable incremento de 2 a 3 semanas antes del parto). En los eosinófilos de individuos normales se ha estimado una cantidad aproximada de $5.000\mu\text{g}$ de MBP/ 10^6 células (medido en extractos por radioinmunoanálisis). También se ha localizado en los basófilos, aunque en éstos la cantidad es muy inferior ($0,14\mu\text{g}/10^6$ células)¹⁰⁶.

Entre sus funciones destacan: -Toxicidad sobre parásitos, siendo capaz de lesionar directamente los esquistosomas de *S. mansoni*, las larvas de *Trichinella spiralis*, las microfiliarias de *Brugia pahangi*, ect;-Toxicidad sobre las células de mamíferos, siendo tóxica para las células tumorales murinas y para muchas células de mamíferos de una forma dosis-dependiente. En este sentido, son importantes las funciones que realiza como mediador de las enfermedades por hipersensibilidad y en concreto como mediador de la inflamación en el asma bronquial. Así, se ha descrito que la MBP es una potente toxina para las células epiteliales del

aparato respiratorio, sobre las que produce lesiones y descamación^{124,125}; se hallaron depósitos extracelulares de MBP en biopsias bronquiales postmortem, realizadas en pacientes fallecidos de ataques asmáticos⁴¹; se han encontrado niveles elevados en esputos de pacientes asmáticos¹²⁶, y en líquidos de BAL, correlacionándose sus concentraciones con la cantidad de eosinófilos y la actividad de la enfermedad^{56,127,128}.

;-Estimulación sobre basófilos y mastocitos para la liberación de histamina¹²⁹; y -Efectos sobre la coagulación, habiéndose demostrado en algunos estudios que la MPB neutralizó el efecto de la heparina sobre la coagulación de la sangre, y aumentó el tiempo de coagulación de tres a cinco veces¹³⁰.

I.7.4.2.2. Neurotoxina derivada de los eosinófilos (EDN) Y EPX.

Los eosinófilos contienen una potente neurotoxina que puede lesionar gravemente las neuronas mielinizadas en animales de experimentación. Gordon describió por primera vez esta reacción neurotóxica en 1932, por lo que se denomina fenómeno de Gordon¹³¹. Se localiza en la matriz granular, siendo su peso molecular de 18000 y su punto isoeléctrico básico. Se ha determinado la secuencia de aminoácidos N-terminal de la EDN y se ha comprobado que ésta presenta notables homologías con la ECP, con identidad en 37 de los 54 residuos N-terminales. Son homólogas, al igual que la ECP, a la RNasa pancreática; sin embargo la EDN posee unas 100 veces más actividad RNasa que la ECP.

Se ha descrito, además, la proteína X de los eosinófilos (EPX), que podría ser la misma EDN. Su semejanza estriba en que el peso molecular es similar, posee actividad RNasa comparable, produce

fenómeno de Gordon, es helmintotóxica relativamente débil (al igual que la EDN) contra el estadio inicial de los esquistosomas *S. mansoni* y ambas son capaces de inhibir la proliferación linfocitaria. Todos estos resultados han sugerido que tienen propiedades bioquímicas similares y reactividades inmunológicas comparables, por lo que se piensa que podrían ser la misma proteína.

En cuanto a las funciones de la EDN además de las ya referidas de inhibición de los linfocitos de sangre periférica, actividad ribonucleasa y la neurotoxicidad a través de la producción del fenómeno de Gordon, posee, al igual que la MBP toxicidad sobre parásitos (esquistosomas de *S. mansoni*, microfilarias ect.). Ultimamente existen trabajos que han demostrado la elevación de la EPX, tanto en suero como en BAL, en pacientes asmáticos, en comparación con normales, así como tras provocación antigénica, y su descenso tras tto antiinflamatorio, con lo que su cuantificación puede indicar el grado de activación del eosinófilo^{132,133}.

I.7.4.2.3. Peroxidasa de los eosinófilos (EPO).

Se diferencia de la mieloperoxidasa de los neutrófilos o los monocitos por sus diferencias características en el espectro de absorción y los grupos hemo prostéticos.

Se localiza en la matriz granular, posee un peso molecular que oscila, según los estudios, de 67000 a 77000, tiene un punto isoeléctrico superior a pH de 11 y está formada por dos subunidades (una cadena pesada y otra ligera). La EPO purificada es capaz de oxidar, en presencia de H₂O₂, haloides para producir

ácidos hipohalosos muy reactivos. Entre sus funciones están precisamente las producidas por el sistema EPO-H₂O₂-haloide que es capaz de destruir microorganismos y células tumorales, además de poder desempeñar un papel en la respuesta inflamatoria. El complejo formado por la EPO y los gránulos del mastocito es más eficaz que la EPO libre en la estimulación de la secreción de mastocitos. Estos hallazgos permiten formular la hipótesis de que los eosinófilos liberan EPO, y que la EPO, en presencia de H₂O₂ y haloide, inician la secreción de los mastocitos. Por último, se ha descrito entre sus funciones la inactivación de leucotrienos, ya sea reduciendo su actividad biológica (LTD₄), o su actividad quimiotáctica (LTB₄)^{106,115,134}.

I.7.4.2.4. Proteína catiónica del eosinófilo (ECP) (ver apartado).

I.7.4.3. Otras enzimas y mediadores de los eosinófilos.

Se han asociado al eosinófilo otras enzimas que revisaremos brevemente: 1) la arilsulfatasa B que se localiza en los gránulos pequeños de los eosinófilos, en mayor cantidad que en los neutrófilos, y 2) la colagenasa del eosinófilo que es capaz de degradar el colágeno de los tipos I y III (los dos componentes principales del tejido conjuntivo del parénquima pulmonar humano).

Otros grupos de mediadores, producidos por los eosinófilos y que participan en la inflamación son: 1) **Factor activador de las plaquetas (PAF)**: se sintetiza a partir de una enzima con actividad acetiltransferasa. Esta actividad se ha conseguido estimular mediante varias sustancias que en condiciones normales actúan como factores quimiotácticos para los eosinófilos, tales como la

ECF-A y el C5a. Así pues, la biosíntesis y liberación de PAF puede producirse como consecuencia de la activación quimiotáctica de los eosinófilos, pudiendo ser otro de los mediadores de las enfermedades inflamatorias.

2) Eicosanoides:

La producción de 15-HETE, leucotrienos LTC₄ y LTD₄ ha sido demostrada en eosinófilos humanos, tanto de individuos normales, como de pacientes con eosinofilia. En comparación con el neutrófilo se ha observado que los eosinófilos sintetizan fundamentalmente LTC₄, mientras que los neutrófilos LTB₄¹³⁵.

I.7.5. EOSINOFILOS DE BAJA DENSIDAD Y PROCESO DE DEGRANULACION.

Se ha podido constatar en diversas patologías (síndrome hipereosinofílico, parasitosis, alergias y neoplasias), la existencia de dos poblaciones de eosinófilos en sangre periférica que se pueden distinguir basándose en su densidad en gradientes de gel: normodensos e hipodensos^{106,115}. El número de eosinófilos de baja densidad se correlaciona positivamente con el grado de eosinofilia periférica¹³⁶ y se encuentran significativamente elevados en pacientes asmáticos en relación con la población normal, relacionándose esta elevación con la gravedad del asma y descendiendo tras tratamiento con corticoides inhalados¹³⁷. Estos eosinófilos parecen ser células activadas, con aumento del consumo de oxígeno, mayor producción de superóxido y liberación de Leucotrieno C₄, mayor capacidad citotóxica sobre sustratos recubiertos de anticuerpos y mayor número de receptores para Fc de IgA e IgE. El origen de estas células no está claro, y se ha sugerido que pueden derivar de los eosinófilos normodensos tras

degranulación, o bien ser liberados como hipodensos desde la médula ósea¹¹⁵.

En cuanto al proceso de degranulación, se han realizado estudios exponiendo a los eosinófilos a esquistosomas cubiertos con la IgG, y modelos experimentales que utilizan grandes superficies cubiertas de IgG, siendo de esta forma inducida la degranulación (que queda determinada por la liberación de sus proteínas granulares). En modelos que exponen los eosinófilos a estafilococos se objetivan, mediante microscopía de contraste de interferencia, los siguientes sucesos: marginación de los gránulos a través de la membrana plasmática y su descarga ulterior al espacio extracelular. Las células degranuladas son de mayor tamaño que las células en reposo, de forma ameboide y con grandes áreas sin citoplasma. Con microscopía electrónica, la observación de la pérdida de densidad electrónica en los eosinófilos, puede constituir un signo precoz de activación y degranulación incipiente. Otras características que pueden indicar degranulación son la aparición de eosinófilos vacuolados y células con pocos gránulos¹¹⁴.

Los agentes farmacológicos que incrementan el nivel de AMP cíclico intracelular, tales como isoproterenol, indometacina, prostaglandina E1, prostaglandina E2, histamina y teofilina, cromolín sódico, inhiben la degranulación en sistemas experimentales. Por el contrario, diversas sustancias inmunologicamente activas entre las que se encuentran el suero activado por endotoxina ECF-A, la fitohemaglutinina, la concavalina A, el levamisol, ect, la inducen¹⁰⁶.

Estudios recientes^{120,138} ponen de manifiesto que el proceso de liberación de las proteínas granulares es selectivo, produciéndose a través de diversos receptores de membrana: el estímulo del receptor para C3b da lugar a liberación de ECP Y EDN/EPX; al estimular el receptor para Fc de IgG se libera ECP; la estimulación del receptor para Fc de IgE provoca liberación de EPO y MBP, por último cuando se utilizan agonistas de la proteína-quinasa C, se liberan grandes cantidades de EPX/EDN, y moderadas de EPO y ECP.

I.7.6.FACTORES QUIMIOTACTICOS Y ACTIVADORES.

Los eosinófilos son células dotadas de movilidad y capaces de responder a estímulos por quimiocinesis (movimientos sin dirección definida) o quimiotaxis (migración dirigida hacia un lugar a través de un gradiente de concentración del estímulo). Por este motivo, los factores quimiotácticos pueden regular el aflujo y acúmulo de eosinófilos en los tejidos o en las zonas de inflamación, y de este modo, que la célula esté presente en el lugar donde ha de actuar como célula efectora.

Son muchos los factores que pueden inducir la quimiotaxis eosinofílica. Debido a la asociación de las reacciones hísticas de hipersensibilidad inmediata con la acumulación de eosinófilos, se ha prestado mucha atención a los factores quimiotácticos de los eosinófilos derivados de los mastocitos. Estos factores comprenden el ECF-A, el LTB₄ y la histamina. Otros factores como el PAF se considera que puede ser aún más potente en esta función, indicándose actualmente que puede desempeñar un papel importante en la mediación de la infiltración de los eosinófilos

en zonas de inflamación alérgica. En este mismo sentido, otros derivados del ácido araquidónico como el ácido 5-HETE y E-HPETE, la prostaglandina PGD₂, pueden ejercer esta función.

Por otro lado, las sustancias derivadas de las células T y de los monocitos, implicadas en las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado, parecen ser responsables también del mantenimiento de la infiltración eosinofílica. Así, se ha mostrado que el ESP (promotor de la activación de eosinófilos), derivado de linfocitos sensibilizados estimulados por antígeno, es quimiotáctico sobre todo para los eosinófilos. La activación del sistema del complemento genera factores proteolíticos tales como el C5a y el complejo C-567, que son quimiotácticos para los eosinófilos y otros leucocitos^{106,115}.

Por último, cada vez existen más estudios que indican la importancia de las citoquinas como mensajeros intercelulares en múltiples funciones, entre las que se incluye la quimiotaxis¹¹⁶. Serán evaluadas posteriormente en el capítulo dedicado a ellas. Entre los factores activadores¹¹⁵ podemos citar: el ESP o promotor de la activación de los eosinófilos, procedente de los linfocitos (citado con anterioridad por su función quimiotáctica); el factor activador de los eosinófilos, procedente de las células mononucleares; el factor potenciador de la citotoxicidad de los eosinófilos (M-ECEF), igualmente derivado de los monocitos como el factor de necrosis tumoral (TNF). Los mastocitos producen también factores activadores, como los mencionados ECF-A, histamina ó LTB₄.

Por último dentro de las funciones del CSF no sólo se encuentra la estimulación de colonias de eosinófilos, sino que también

incrementa una serie de actividades de los eosinófilos, siendo las funciones del GM-CSF humano recombinante (funcionalmente análogo al anterior), idénticas en cuanto a la capacidad de activación eosinofílica¹³⁹.

I.8. LA PROTEINA CATIONICA DEL EOSINOFILO (ECP).

I.8.1. PROPIEDADES BIOQUIMICAS-LOCALIZACION:

Fue aislada y purificada inicialmente de los eosinófilos de pacientes con leucemia mieloide crónica por Olsson y Venge en 1974¹⁴⁰. Posteriormente lo fue en eosinófilos de individuos normales¹⁴¹.

Está constituida por un componente mayor y dos menores. Las investigaciones y actividades biológicas han sido referidas para el componente mayor. El número de residuos de aminoácidos que constituyen este componente queda reflejada en la tabla 1, donde puede observarse el alto contenido en ácido aspártico y arginina. Contiene aproximadamente 2,5 moles de zinc por mol de proteína¹⁴². La secuencia parcial de aminoácidos N-terminal de esta proteína presenta homologías notables con la de la EDN, y, de forma más sorprendente, con la de la ribonucleasa pancreática¹⁴³. Así, se ha indicado que esta proteína posee actividad RNasa, aunque unas 100 veces menor que la de la EDN¹⁴⁴.

Su peso molecular es de 21000 y tiene su punto isoeléctrico básico con pH en torno a 11. Se ha calculado un contenido de 25-35 μ g de ECP/10⁶ eosinófilos, correspondiendo aproximadamente al 30% de las proteínas contenidas en los gránulos del eosinófilo^{127,141,142}.

El tiempo medio de eliminación de la ECP in vivo (t_{1/2}), cuando es analizada en suero, se ha estimado alrededor de los 65 minutos¹⁰⁴.

En los estudios llevados a cabo con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la ECP se observaron diferencias entre las formas de almacenamiento y secreción de la molécula.

TABLA 1
Características bioquímicas del componente mayor de la ECP*.

Aminoácidos	Numero de residuos
Acido Aspártico	34
Acido Glutámico	12
Glicina	6
Alanina	12
Valina	11
Leucina	11
Isoleucina	11
Serina	8
Treonina	11
Cisteína	10
Meteonina	1
Prolina	15
Fenialanina	8
Tirosina	5
Histidina	5
Lisina	1
Arginina	21
Triptófano	2
Total	184

*peso molecular 21000;punto isoeléctrico pH > 11.

Los anticuerpos EG1 reconocen ambas formas de ECP, la de almacenamiento y la de secreción, mientras que los EG2 sólo reconocen la ECP secretada o extraída¹⁴⁵. Los EG2 reaccionan con la EPX y no reaccionan con eosinófilos en reposo, mientras que sí lo hacen tras la fagocitosis y tras la activación por factor potenciador de la citotoxicidad de los mismos.

Así pues, los EG2 parecen reconocer los eosinófilos activados, lo que se ha utilizado para identificar estas células a partir de tejidos y sangre en diversas enfermedades^{145,146}. Así, recientemente se ha determinado en sangre (por citometría de flujo) la cantidad de eosinófilos, marcados con el anticuerpo monoclonal EG2, en grupos de asmáticos extrínsecos inestables, estables y población normal, encontrándose diferencias significativas entre los niveles del primer grupo y los siguientes, por lo que se indica la posibilidad de utilizar esta determinación como marcador de la actividad inflamatoria en los enfermos asmáticos¹⁴⁷.

En cuanto a su localización, tanto mediante el análisis con microscopía inmunoeléctronica con oro coloidal, como utilizando anticuerpos EG2 (que como se ha comentado reaccionan tanto con la ECP como con la EPX), se ha establecido en la matriz granular¹²⁷.

I.8.2.FUNCIONES.

-No posee actividad bactericida o esterolítica.

-Efectos sobre la coagulación y fibrinólisis: La ECP se une a la heparina y neutraliza su actividad anticoagulante¹⁴². Acorta el tiempo de coagulación del plasma en una forma dosis-

dependiente¹⁴⁸. Este efecto no se observa en plasma deficiente de factor XII y, en cambio, sí se observa en plasma deficiente en factores V, VII, VIII, IX, X y XI, lo que indica que el factor XII es el sustrato para la interacción de la ECP. En cambio, a concentraciones elevadas, la ECP prolonga el tiempo de coagulación. La actividad de la calicreína también está potenciada por la ECP.

Además, la ECP altera la fibrinólisis¹⁴², como se demuestra por su efecto potenciador sobre la activación de plasminógeno inducida por uroquinasa. En cambio, anula la activación del plasminógeno inducida por la estreptoquinasa, debido a la formación de un precipitado entre la estreptoquinasa y la ECP.

-Toxicidad sobre parásitos. La ECP es una potente toxina para los esquistosomas de *S. mansoni*, siendo comparativamente 8 a 10 veces más activa que la MBP. Sin embargo, aun cuando desde el punto de vista molar es una helmintotoxina más potente, debido a la mayor abundancia en los granulos del eosinófilo de MBP, es ésta la responsable de la mayor parte de la toxicidad de los experimentos in vitro. No obstante, esta situación in vivo podría ser diferente, ya que estas proteínas son liberadas en un espacio relativamente confinado y podrían alcanzarse concentraciones elevadas a nivel extracelular¹⁰⁶.

-Neurotoxicidad: tal como se describió para la EDN, se ha indicado que la ECP es una potente neurotoxina, provocando como aquella el fenómeno de Gordon.

-Efecto sobre la proliferación linfocitaria. La ECP origina una inhibición dosis-dependiente de la proliferación de linfocitos de sangre periférica humana inducida por fitohemaglutinina. El

efecto es reversible y podría implicar células supresoras¹⁴⁹.

-Efecto sobre los mastocitos. La ECP estimula la liberación de histamina por los mastocitos. Sin embargo, es incapaz de estimular la liberación de histamina por los basófilos a concentraciones comparables a las de la MBP¹²⁹.

-Citotoxicidad. Son múltiples los estudios realizados recientemente en tejidos de biopsias bronquiales que han establecido la importancia de la ECP como causante de daño epitelial.

El papel de la ECP como mediador de la inflamación en el asma será revisado más exhaustivamente en el siguiente capítulo.

I.8.3. LA ECP COMO MEDIADOR DE LA INFLAMACION EN EL ASMA BRONQUIAL.

I.8.3.1. Datos en Biopsias bronquiales:

Los trabajos realizados en los últimos años han mostrado la ECP en biopsias bronquiales de pacientes asmáticos, a través de los anticuerpos monoclonales EG1 y ,sobre todo EG2. Estos anticuerpos se unen a esta proteína e indentifican la ECP almacenada (EG1) ó secretada por los eosinófilos activados (EG2)¹⁴⁵.

Así, el estudio realizado por DJukanovic y cols.¹⁵⁰ demuestra una cantidad significativamente mayor de eosinófilos activados, con características de degranulación (EG2+), en la submucosa y epitelio de biopsias de pacientes asmáticos, en relación con los normales. En éstos la cantidad fue escasa o ausente, mientras que en los atópicos no asmáticos se hallaron valores intermedios. Hallazgos similares describen recientemente Fukuda y cols, en

biopsias bronquiales¹⁵¹ y Woolley y cols¹⁵², tanto en biopsias como en BAL.

En otros estudios, como los efectuados por el grupo de Bousquet^{51,53} se ha identificado (por anticuerpos monoclonales referidos EG1 y EG2), la localización intracelular de la ECP en biopsias de pacientes normales, mientras en los asmáticos se ha encontrado en situación intracelular en la capa submucosa, e intracelular ó en depósito extracelular bajo la membrana basal. Este depósito extracelular corresponde a la ECP liberada por los eosinófilos degranulados y está relacionado con la lesión y destrucción del epitelio subyacente. Así, se encuentran zonas con eosinófilos no degranulados cuyo epitelio no presenta ningún signo de lesión, y por el contrario zonas en las que los eosinófilos están degranulados (y por tanto con incremento de ECP extracelular), donde el daño epitelial es marcado. Por este motivo, se ha indicado que la ECP es uno de los mediadores con mayor capacidad para producir citotoxicidad sobre el epitelio bronquial^{153,154,155}, y de ahí deriva su importancia como mediador de la inflamación asmática.

I.8.3.2.Datos en BAL.

En varios trabajos se ha señalado el incremento de los niveles de ECP en líquidos de BAL obtenidos de pacientes asmáticos en relación con los normales y su correlación tanto con la celularidad existentes, como con parámetros clínicos o funcionales^{51,53,59,60,156-159}. Expodremos algunos de ellos:

En los realizados por el grupo de Bousquet y cols^{51,53,60}, se han establecido, no sólo la elevación significativa de las cifras de

eosinófilos y los niveles de ECP en muestras de BAL de pacientes asmáticos en relación con los normales, sino también su correlación con la gravedad clínica del asma (estimada mediante los scores de Aas).

En el estudio efectuado por Adelroth y cols.⁵⁹, además de destacarse los anteriores hallazgos (elevación de las cifras de eosinófilos y niveles de ECP en BAL), se demuestra descenso significativo de la cantidad de ECP tras 4 semanas de tto con budesonida inhalada, mientras no descienden significativamente las cifras de eosinófilos. En este mismo trabajo se establece por un lado una correlación positiva entre las cifras de eosinófilos y los niveles de ECP, y por otro (de forma destacada) una correlación positiva entre los niveles de ECP en BAL y séricos, por lo que se puede sugerir que la estimación en suero refleja lo que sucede a nivel bronquial.

En el trabajo de Rak y cols¹⁵⁶ se analizan los niveles de Eosinófilos y ECP en BAL de pacientes con rinoconjuntivitis y asma polínica antes y durante la primavera, según fuesen tratados o no con inmunoterapia, encontrando niveles elevados significativamente en el grupo de no tratados en la determinación primaveral con respecto a los tratados.

Fergusson y cols¹⁵⁴, estableció por su parte una correlación entre los niveles de eosinófilos en BAL y la respuesta a la histamina, mientras que no encontró esta correlación para la ECP.

Por último Trigg y cols¹⁶⁰ no encuentra descenso significativo en los niveles de ECP en BAL, aunque sí en las biopsias bronquiales entre un grupo de asmáticos tratados durante 4 meses con dipropionato de beclometasona y otro con placebo.

I.8.3.3. Datos en suero.

Ultimamente se está prestando especial atención al análisis de los niveles séricos de este mediador.

Desde hacía bastante tiempo era conocida la existencia de eosinofilia en el asma bronquial activa y el descenso los niveles tras el tratamiento con corticoides.

No ha sido, sin embargo, hasta los últimos años cuando se han estimado en suero las proteínas liberadas por estas células tras su activación.

En algunos trabajos los niveles séricos de ECP en asmáticos muestran gran variabilidad, incluso predominando los valores normales o bajos, siendo atribuido este hecho al consumo y eliminación rápida de esta proteína en el asma activo^{161,162,163}.

En otros se discute la utilidad de la medición de estos niveles como forma de monitorización de actividad de la enfermedad asmática. Así, en el trabajo de Juntunen-Backman y cols¹⁶⁴, aunque estos valores descienden significativamente a los 5 meses en el grupo tratado con budesonida (a diferencia del tratado con cromoglicato disódico), no se observaron cambios en la función pulmonar, por lo que no se pudieron establecer correlaciones con significado fisiopatológico. En un anterior estudio de Fergusson y cols¹⁵⁷, tampoco se pudo establecer correlación de los niveles de ECP séricos y los resultados del test de provocación con histamina. Este mismo autor publicó recientemente un trabajo¹⁶⁵ en el que no encuentra diferencias significativas en los niveles de ECP entre asmáticos sintomáticos, asintomáticos y riníticos alérgicos, así como tampoco, correlación con parámetros funcionales o prueba de provocación con histamina.

Sin embargo, son numerosos los estudios recientes que indican por un lado su cantidad significativamente mayor en los pacientes asmáticos en relación a la población normal^{132,133,166,167,168}; su incremento en el asma sintomática y la diferencia en sus niveles con respecto a los asmáticos estables^{133,169} y; la existencia de niveles significativamente mayores en asmáticos atópicos que en los que no lo son^{170,171}.

Se ha demostrado además su elevación en la estación primaveral en el asma polínica¹⁶⁶, en el asma inducida por ejercicio¹⁷², o en la fase tardía tras provocación antigénica^{173,174}.

Se ha subrayado su descenso tras tratamiento con corticoides inhalados ó vía sistémica^{133,164,167,170,175}, así como la inhibición de su incremento en pretratados con corticoides antes de la provocación alérgica¹⁷⁴, o con inmunoterapia específica antes de la estación primaveral en polínicos^{156,176}.

La mayoría de estos estudios han sido realizados en niños, oscilando los valores medios de ECP en la población normal de 6¹⁰⁴a 13µg/l¹⁶⁶, siendo establecido en algunos trabajos los 16µg/l como el límite superior de la normalidad^{164,165}.

I.8.3.4.Datos en otras muestras.

En muestras de esputo inducido se ha establecido el aumento de la concentración de ECP en asmáticos estables en relación con los niveles obtenidos en controles sanos¹⁷⁷, su elevación tras prueba de provocación alérgica¹⁷⁸, y su descenso tras tratamiento con corticoides (prednisona)¹⁷⁹.

En muestras de lavados nasales, como después comentaremos, también se han encontrado niveles de ECP significativamente

mayores en pacientes con rinitis alérgica, descendiendo tras el uso de esteroides tópicos.

Todo lo anterior ha sugerido la posibilidad de la utilización de los niveles de ECP (séricos, en lavados nasales o esputo), para monitorizar la actividad de la inflamación en el asma y la respuesta al tratamiento esteroideo.

Por último es necesario destacar que los niveles de ECP no sólo se han encontrado elevados en suero en el asma bronquial; en la dermatitis atópica (DA) también se han hallado niveles elevados en pacientes con exacerbación clínica aguda de su enfermedad, descendiendo tras su mejoría, sugiriéndose recientemente la posibilidad de realizar determinaciones de ésta como forma de monitorizar de manera no invasiva la actividad de la DA¹⁸⁰. En otras patologías asociadas a una activación de los eosinófilos también se han encontrado niveles elevados de ECP, como son las referidas enfermedades parasitarias¹⁵⁴, otras infecciones (HIV¹⁸¹, neumonías por mycoplasma¹⁸², bronquiolitis por virus sincitial respiratorio¹⁸³), lesiones autoinmunes de las articulaciones¹⁸⁴, o del intestino¹⁸⁵, ect.

I.9. OTROS MEDIADORES IMPLICADOS EN LA INFLAMACION.

El resto de las células que participan en la inflamación producen múltiples mediadores, algunos de ellos similares a los elaborados por los eosinófilos, y otros específicos de cada célula.

I.9.1. MEDIADORES PREFORMADOS.

Dentro de los mediadores preformados en mastocitos y basófilos, liberados en las reacciones de hipersensibilidad inmediata, destaca la histamina. Entre sus características sobresalen que: -es sintetizada en el aparato de Golgi de los mastocitos y basófilos mediante descarboxilación de un aminoácido precursor, la histidina; -se encuentra en el hombre en una cantidad aproximada de 2-5 pg/célula; -posee una amplia variedad de actividades biológicas mediadas por la activación de receptores celulares de superficie (H1,H2). Así, la ocupación de receptores H1 por la histamina, origina la contracción de la musculatura lisa de las vías respiratorias y el aparato gastrointestinal, siendo utilizada, como es conocido, de prueba para determinar el grado de reactividad inespecífica de las vías respiratorias. Es destacable, además, su acción vasoactiva, puesta en evidencia por la reacción papuloeritematosa tras la inyección intradérmica de la misma. La mayor parte de esta reacción es una respuesta secundaria a la estimulación de receptores H1, si bien la estimulación de los receptores H2 podría desempeñar un papel de menor importancia. La importancia de la histamina como mediador vasoactivo en la enfermedad alérgica humana se puede constatar por la eficacia de los antagonistas de los receptores H1 para modificar el curso de enfermedades asociadas a reacciones

dependientes de la IgE²⁸. Así, existen trabajos implicando a la histamina como mediador de la RAP, encontrándose incrementos de su concentración tanto en plasma¹⁶³, como en BAL en esta fase.

-Otros mediadores preformados que pueden ser liberados por los mastocitos en las reacciones de hipersensibilidad son **factores quimiotácticos** (ECF-A, IFA ó factor inflamatorio de la anafilaxia, con acciones quimiotáxicas y activadoras de eosinófilos), **serotonina**, **proteoglicanos** (heparina, condroitín sulfato), y **enzimas** como las hidrolasas ácidas (β -hexosaminidasa, β -glucuronidasa, β -D-galactosidasa, arilsulfatasa), enzimas oxidativas (superóxido dismutasa, peroxidasa) y proteasas neutras. Entre éstas últimas destaca la triptasa, quimasa y carboxipeptidasa. La mayoría de los mastocitos pulmonares contiene fundamentalmente triptasa, con capacidad para activar la bradiquinina, las fracciones C3a y C5a del complemento (conocidas como anafilotoxinas), aumentar la reactividad bronquial y degradar el VIP (péptido intestinal vasoactivo), de acción broncodilatadora.

I.9.2.MEDIADORES SINTETIZADOS "DE NOVO".

Dentro de los mediadores de mastocitos y basófilos de nueva síntesis son destacables:

I.9.2.1.Mediadores del ácido araquidónico (eicosanoides).

-Entre los eicosanoides, productos de la vía enzimática de la ciclooxigenasa, sobresalen, por sus efectos en el asma bronquial las Prostaglandinas PGD₂, PGF₂ y el Tromboxano TXA₂. El producto de la ciclooxigenasa más abundante (sintetizado tras activación inmunológica de los mastocitos) es la PGD₂. Una activación máxima

da lugar a la producción de 50 a 100 ng/10⁶ de mastocitos de PGD₂, siendo esta cantidad de 10 a 20 veces menor que la cantidad de histamina liberada observada en estas circunstancias²⁸.

Además de los mastocitos, existen otra serie de células implicadas en la producción de prostaglandinas al poseer receptores de superficie para el Fc de la IgE. Entre estas células se encuentran los macrófagos, los linfocitos T y B, los monocitos y, como ya fue referido, los eosinófilos^{25,28}.

-Entre los eicosanoides, derivados de la vía enzimática de la lipooxigenasa, son destacables los leucotrienos LTB₄, LTC₄, LTD₄ y LTE₄.

El LTC₄ liberado por los mastocitos, posiblemente se convierte en LTD₄ por acción de otras células pulmonares, hipótesis que concuerda con el rápido metabolismo del LTC₄ exógeno observado en el pulmón humano. Los mastocitos humanos obtenidos de la luz de las vías respiratorias por BAL también liberan eicosanoides en respuesta a la activación dependiente de calcio o de IgE. A diferencia de los mastocitos del parénquima pulmonar, estas células liberan bastante más PGD₂ y mucho menos LTC₄.

Al contrario que los mastocitos pulmonares, los basófilos humanos poseen una capacidad relativamente baja para el metabolismo oxidativo dependiente de la IgE del ácido araquidónico. La estimulación inmunológica no da lugar a la liberación de PGD₂, pero puede inducir la producción de LTC₄, si bien en cantidades 10 veces menores que los mastocitos pulmonares.

Tras su estimulación por diversos agentes, los eosinófilos liberan preferentemente LTC₄¹¹¹.

En cuanto a las acciones biológicas de los eicosanoides, son agonistas en la musculatura lisa de las vías respiratorias. Las prostaglandinas PGD₂, PGF₂α, los leucotrienos LTC₄, LTD₄ y quizás el TXA₂, constituyen los agentes constrictores más potentes probados en las vías respiratorias humanas tanto in vitro como in vivo²⁸.

Se ha demostrado elevación del leucotrieno LTE₄ en orina, tras una prueba de provocación alérgica¹⁸⁷, en el asma aguda grave¹⁸⁸ o en el asma inducida por ejercicio¹⁸⁹. Por otro lado, los ensayos efectuados hasta ahora coinciden en que no parece existir un efecto de los leucotrienos sobre la sensibilidad de las vías aéreas en las personas normales examinadas pero que, sin embargo, en pacientes asmáticos, los leucotrienos C₄, D₄ y E₄ incrementan la sensibilidad de las vías respiratorias a la histamina¹⁹⁰ y que sus niveles en sangre pueden reflejar el grado de severidad del asma aguda¹⁹¹.

En la rinitis alérgica también se ha demostrado, tras prueba de provocación alérgica, un incremento de PGD₂, LT C₄, D₄ y E₄ en lavados nasales¹⁹².

A diferencia de la PGD₂, la PGE₂ relaja el tono de la musculatura lisa de las vías respiratorias in vitro e in vivo y por ello podría actuar como mecanismo de control natural de los prostanooides broncoconstrictores. Así, en un estudio reciente¹⁹³ en el que se administró PGE₂ inhalada (frente a placebo), 5 minutos antes de la prueba de provocación con alérgeno, se obtuvo que este mediador originó una importante inhibición de las respuestas precoz, tardía y de la reactividad bronquial frente al alérgeno .

La PGI₂ también podría ejercer algún tipo de control adicional, ya que, si bien este prostanoide generalmente no actúa como broncodilatador cuando es inhalado por el hombre, sí proporciona protección contra la broncoconstricción cuando es administrado antes de la estimulación con metacolina o PGD₂²⁸.

Por otro lado, los eicosanoides ejercen muchas de sus acciones sobre la musculatura vascular lisa, sobre todo aumentando la permeabilidad vascular y provocando vasodilatación o vasoconstricción dependiendo del tipo de mediador que se trate.

En las tablas 2 y 3 quedan resumidos cada uno de los eicosanoides y sus acciones principales en la inflamación del asma.

En los últimos años se están investigando fármacos que inhiben a estos mediadores (antileucotrienos). Así, a modo de ejemplos, se han estudiado antagonistas de los receptores de LD₄, como el MK-571 con, al parecer, efecto inhibidor del asma inducida por alérgeno¹⁹⁴; y el ICI 204, 219 con efectos en el asma inducida por el ejercicio¹⁹⁵ ó alérgeno¹⁹⁶.

En este sentido, existen varios ensayos clínicos en fases avanzadas, y posiblemente en un futuro inmediato dispongamos de fármacos que puedan ser utilizados de forma habitual en pacientes asmáticos.

TABLA 2

Productos de la ciclooxigenasa y acciones

PRODUCTOS DE LA CICLOOXIGENASA	Efectos
PGE2	<ul style="list-style-type: none"> *Dilatación y aumento de la permeabilidad de la microvasculatura. *Broncodilatación. *Supresión de la actividad linfocitaria y de los leucocitos PMN.
PGD2	<ul style="list-style-type: none"> *Broncoconstricción.
PGD2/I2	<ul style="list-style-type: none"> *Dilatación y aumento de la permeabilidad de la microvasculatura. *Supresión de la actividad leucocitaria.
PGI2	<ul style="list-style-type: none"> *Supresión de adherencia y agregación plaquetar. *Vasodilatación.
PGF2alfa	<ul style="list-style-type: none"> *Broncoconstricción. *Constricción de la microvasculatura y los vasos pulmonares.
TXA2	<ul style="list-style-type: none"> *Broncoconstricción. *Constricción de la microvasculatura. *Estimulación de la adherencia y agregación plaquetar. *Aumento de la adherencia de leucocitos PMN.

PG: Prostaglandinas. Tx: Troboxanos.

PMN: Polimorfonucleares.

TABLA 3

Productos de la lipooxigenasa y acciones

PRODUCTOS DE LA LIPOOXIGENASA	Efectos
LTC4/D4/E4	<ul style="list-style-type: none"> *Contracción de la musculatura lisa. *Broncoconstricción. *Estimulación de la secreción de moco y electrólitos en las vías respiratorias. *Dilatación y aumento de la permeabilidad de la microvasculatura.
LTE4	<ul style="list-style-type: none"> *Inducción de Hiperreactividad de las vías respiratorias.
LTB4	<ul style="list-style-type: none"> *Estimulación de la quimiotaxis y activación leucocitarias. *Aumento de la adherencia leucocitaria al endotelio. *Supresión de la función de los linfocitos T. *Aumento de la actividad de las células NK.
14,15-diHETE 5,6-15 y 5,14,15 tri-HETE.	<ul style="list-style-type: none"> *Inhibición de la actividad de las células NK.
15-HPETE	<ul style="list-style-type: none"> *Supresión de la actividad de los linfocitos T y receptores Fc.

LT: Leucotrienos. **HETE:** ácidos hidroxieicosatetraenoicos.

HPETE: ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos

I.9.2.2 Factor activador de las plaquetas.

Este mediador, denominado recientemente PAF-aceter o AGEPC (alquilglicerileterfosforilcolina), fue descrito inicialmente como mediador de la anafilaxia derivado de los basófilos en el conejo, si bien trabajos posteriores han demostrado la existencia de liberación y actividad de AGEPC en una amplia variedad de células de otras especies, entre ellas las del hombre. La liberación de AGEPC se describió por primera vez in vitro en basófilos sensibilizados de conejo expuestos a anti-IgE, pero los basófilos humanos podrían no constituir una fuente importante de este mediador, existiendo aún una controversia considerable sobre la producción de AGEPC en este tipo celular. La producción de AGEPC por mastocitos humanos es también controvertida. Si bien al principio se comunicó que los mastocitos humanos liberaban AGEPC en respuesta a diversos estímulos, investigaciones posteriores más detalladas en la rata sugieren que los macrófagos son responsables de esta liberación.

Se ha demostrado que otros muchos tipos de células inflamatorias poseen capacidad para sintetizar y liberar AGEPC, si bien las cantidades liberadas pueden representar sólo una pequeña parte de la cantidad sintetizada. Entre estas células se encuentran los neutrófilos humanos, los macrófagos alveolares sensibilizados estimulados por alérgeno, los eosinófilos estimulados con A23187 o C5a, las plaquetas, los monocitos, ect²⁸.

En cuanto a sus acciones biológicas, es importante su capacidad para inducir HRB en el hombre: cuando se inhala PAF por voluntarios sanos se produce una obstrucción aguda de las vías aéreas que se resuelve en pocas horas. Sin embargo, se sigue de

HRB que puede persistir durante días o semanas¹⁹⁷. El mecanismo que provoca este estado de hiperreactividad, aunque es discutido, se cree puede estar relacionado con la liberación de histamina endógena¹⁹⁸.

Como se indicó, el PAF es un potente factor quimiotáctico y un posible factor de activación de los eosinófilos en el hombre¹⁰⁶. Esto mismo se ha observado para los neutrófilos, que no sólo sintetizan AGEPC, sino que además experimentan quimiotaxis, cambios en su forma, agregación, liberación de enzimas lisosómicas y producción de aniones superóxido en respuesta al mismo²⁸.

I.9.3. Péptidos mediadores.

Los péptidos mediadores, que actúan como hormonas circulantes, reguladores locales o neurotransmisores, son sintetizados y secretados por células endocrinas y por nervios. Se ha demostrado la presencia de más de 10 péptidos en pulmones de mamíferos, por radioinmunoanálisis o métodos inmunocitoquímicos. Ciertos péptidos se han localizado en células endocrinas mucosas aisladas o en cuerpos neuroepiteliales; otros están presentes dentro de los nervios pulmonares y, por consiguiente, se han llamado neuropéptidos¹⁹⁹. Los más destacados en las vías respiratorias y sus principales funciones son las siguientes:

-Polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) y péptido histidina isoleucina (PHI).

El VIP se trata de un péptido de 28 aa, descubierto originariamente en extractos de pulmón, que se encuentra en los nervios de las vías aéreas humanas. Los principales efectos

farmacológicos que tiene son: relajación del músculo liso, vasodilatación y estimulación de la secreción exocrina.

El PHI contiene 27 aa, es homólogo al VIP y ejerce efectos biológicos similares. Ha sido detectado en el tracto respiratorio superior de algunos animales. Su distribución es similar y provoca una relajación dosis-dependiente del músculo liso aislado de vías aéreas, cuantitativamente similar a la de VIP. Un péptido relacionado, el péptido histidina metionina (PHM), probablemente es la forma humana de PHI y es un potente relajante del bronquio humano *in vitro*¹⁹⁹.

En un reciente trabajo se demuestra la elevación del VIP en secreciones nasales tras estimulación antigénica y provocación nasal con histamina, por lo que se sugiere su papel en algunos de los síntomas de la rinitis alérgica²⁰⁰.

-Sustancia P y taquikininas relacionadas:

En las vías aéreas humanas se han identificado 3 taquikininas (sustancia P, sustancia K o neuroquinina A y una forma de neuroquinina A con un N-terminal llamado neuropéptido K).

Estas taquikininas se encuentran en fibras nerviosas aisladas o, menos frecuentemente, en haces de fibras nerviosas; subepitelialmente o en el interior del propio epitelio de las vías respiratorias; rodeando los vasos sanguíneos y las glándulas submucosas; dentro de fibras musculares lisas bronquiales; y en el entorno local de células ganglionares traqueobronquiales.

Los principales efectos fisiológicos son: dilatación del músculo liso vascular y constricción del músculo liso de las vías aéreas. También estimulan la secreción de las glándulas exocrinas, aumentan la permeabilidad microvascular y producen histamina para

ser liberadas por los mastocitos^{199,201}. El efecto de la neuroquinina A sobre la vía aérea de los asmáticos puede ser inhibido previo tratamiento con nedocromil sódico²⁰¹.

-Péptido calcitonina gen-relacionado (CGRP).

Es un péptido que contiene 37 aa, derivado del mismo gen de la calcitonina. En el sistema nervioso periférico, el CGRP se halla en las neuronas sensitivas y en las fibras nerviosas donde se localiza con las taquikinininas.

Las acciones biológicas incluyen contracción del músculo liso de las vías aéreas y relajación del músculo liso vascular¹⁹⁹.

-Bombesina-péptido liberador de gastrina (GRP).

Tetradecapéptido el primero y con 27 aa el segundo, sólo destacar que recientemente se ha informado de la presencia en el tracto respiratorio, de fibras nerviosas inmunoreactivas a la GRP.

-Neuropéptido Y.

Constituido por 36 aa. En las vías aéreas se ha encontrado inmunorreactividad a NPY en fibras nerviosas que discurren por la adventicia de los vasos sanguíneos y en el músculo liso. La distribución en el tracto respiratorio es similar a la de las fibras nerviosas simpáticas.

Es vasoconstrictor y modula los efectos neurales adrenérgicos.

-Existen otros péptidos como la galanina, la somatostatina y colecistokinina, cuyas acciones en el pulmón no son bien conocidas¹⁹⁹.

I.9.4. Adenosina.

Este compuesto es el principal reservorio de energía intracelular. Se forma durante el metabolismo de la adenosina

trifosfato (ATP), siendo degradado a adenosina monofosfato (AMP), cuando se necesita energía.

El papel de la adenosina como mediador en el asma ha sido sugerido por diversas observaciones. Así, la inhalación de adenosina produce en los asmáticos pero no en las personas sanas una broncoconstricción dosis-dependiente²⁰². Se ha demostrado que es un potente y rápido estimulante de la secreción de las vías aéreas. Tras la agresión antigénica, los asmáticos muestran un aumento bifásico de la concentración de adenosina en plasma, mientras que la estimulación bronquial con metacolina causa solamente un pico. El aumento inicial de adenosina ha sido atribuido a la activación inducida por la IgE de los mastocitos y otras células inflamatorias presentes en las vías aéreas. Por otro lado, se ha demostrado en el hombre que la adenosina aumenta la liberación de mediadores preformados en los mastocitos y basófilos (como la histamina)¹⁹⁹.

Otro argumento usado para indicar el papel de la adenosina en el asma es el efecto antiasmático de la teofilina (conocido antagonista de la adenosina) en condiciones experimentales. Además, ha sido demostrada en sujetos asmáticos la inhibición de la broncoconstricción inducida por la adenosina con el empleo de teofilinas orales o inhaladas, cromoglicato sódico²⁰² o antihistamínicos (terfenadina²⁰³).

Por último, estudios farmacológicos en ratas y en el hombre sugieren que la broncoconstricción inducida por la adenosina se origina por la estimulación de los receptores de adenosina presentes en las terminaciones de nervios vagales postganglionares y en los mastocitos. El sinergismo entre la

acetilcolina liberada y los mediadores mastocitarios es lo que causa la broncoconstricción¹⁹⁹.

I.9.5. Citoquinas.

Las linfocinas, interleucinas o citoquinas (IL) son mensajeros macromoleculares intercelulares solubles, liberados por algunas de las células participantes en la inflamación, para los que existen receptores específicos en la superficie celular y que intervienen de forma destacada en la proliferación, quimiotaxis, activación, etc de éstas. Inicialmente se dividieron en linfoquinas y monoquinas, según fueran producidos por linfocitos o monocitos, respectivamente; o recibieron nombres específicos según su función. Sin embargo, cuando se clonaron los genes que los codifican, y surgió la posibilidad de producir los factores por ingeniería genética en el laboratorio se comprobó que, en su mayoría, pueden producirse por varias estirpes celulares y participar en varias actividades. Se acordó entonces acuñar el término "interleucina o IL", definida como proteína producida por determinados leucocitos que regula el crecimiento y activación de otros leucocitos. Se conocen actualmente más de una veintena de interleucinas. Las características más llamativas de estos factores son su pleiotropismo y redundancia, es decir, la capacidad de cada uno de ellos de ejercer acciones muy diversas, en ocasiones sobre múltiples estirpes celulares, y la propiedad de varias de ejercer una misma función. Esta complejidad es sin duda lo que permite una regulación más fina en cualquier punto y momento. También es característica su vida media muy breve y las cantidades pequeñas en que son producidos, lo que hace que

, en circunstancias normales, su radio de acción sea muy reducido. Esto es evidente para los mediadores elaborados por los linfocitos (vgr IL-2, IL-4 e IL-5), que son producidos en breve espacio de tiempo, en respuesta a estímulos específicos (antígeno), y que ejercen su acción localmente. Por el contrario los producidos mayoritariamente por células no linfoides (por ejemplo IL-1, IL-6 y TNF- α), pueden generarse durante más tiempo en respuesta a estímulos no específicos y aparecer en concentraciones detectables en suero, pudiendo causar efectos nocivos en el huésped.

En general, se originan varios mediadores solubles en respuesta a un estímulo, dependiendo de las poblaciones celulares activadas. Por otro lado, una misma población da lugar a distintos factores ante diferentes estímulos, y el efecto final depende de la combinación de factores presentes. Esto hace difícil conocer con exactitud cuáles son las funciones de cada una de las interleucinas y aún mucho más difícil manipular estas actividades en beneficio del huésped enfermo²⁰⁴.

Dicho lo anterior, es necesario subrayar, que el conocimiento de la propia existencia de las IL, la estructura molecular de cada una de ellas, las células que las producen, sus funciones, y los cambios que se pueden producir en sus niveles tras tratamiento antiinflamatorio, puede ser de importancia crucial para comprender los acontecimientos que tienen lugar en la inflamación del asma. Su cuantificación y modificación con la terapia supondrá, sin duda, un avance importante en el control de esta inflamación. Por estos motivos han sido, y siguen siendo motivo de amplia investigación.

En este sentido, en los últimos años se ha evidenciado la importancia del linfocito T Helper activado en la patogenia del asma, y los dos patrones diferentes de secreción de citoquinas entre las clonas de estos linfocitos (ya mencionados al referirnos a estas células).

Así, en la regulación de la inflamación del asma y rinitis alérgica, se han mencionado con papel más relevante:

-IL-3 y GM-CSF: se elevan en BAL y se correlacionan con los niveles de eosinófilos¹⁰⁸, lo que indica su importancia en la regulación de la función y supervivencia de éstos^{111,205}. Se ha sugerido que la GM-CSF induce la migración transendotelial del eosinófilo²⁰⁶, aumenta la producción de leucocitos progenitores desde la médula ósea, y que junto a la IL-5 (que comentaremos posteriormente), mantiene el proceso inflamatorio crónico²⁰⁷;

-IL-4: Induce la migración²⁰⁸ de los eosinófilos, así como su adherencia mediante la regulación de las moléculas de adhesión (VCAM-1) en las células endoteliales¹¹¹. Induce el cambio del isotipo del linfocito B estimulando la producción de IgE^{87,88}, y aumenta la expresión del receptor de baja afinidad de IgE y del receptor de la FCRII en los linfocitos T y macrófagos. Promueve, en consecuencia, la participación de estas células en la inflamación alérgica¹¹⁶;

-Factor de necrosis tumoral (FNT α): este factor ha sido encontrado en cantidades elevadas en vías respiratorias de asmáticos. Es bien conocido que en animales da lugar a hipersensibilidad aumentada, reclutamiento celular y mayor expresión de moléculas de adhesión²⁰⁹;

-IL-5; sin duda, el factor más importante de crecimiento y

diferenciación de los eosinófilos. Controla de forma directa los niveles de éstos^{87,204}, su maduración, supervivencia, activación^{87,111,210} y acumulación en los lugares de inflamación alérgica²¹¹. En trabajos recientes realizados en BAL, se indica su incremento en el asma alérgica²¹², siendo la citoquina que predomina en este líquido durante la fase tardía de la inflamación producida por alérgeno²¹³.

Por último, se han investigado los efectos que los corticoides pueden tener en la regulación y consiguientes niveles de citoquinas. En este sentido existen evidencias que indican que pueden regular sus funciones (IL 3-4-5²¹⁴), o producir una modulación de la expresión de los genes, en el caso de las IL-4 y 5²¹⁵.

I.9.6.Radicales libres.

Han sido reseñados los diversos mediadores que intervienen en el proceso inflamatorio, como productos altamente especializados, derivados de proteínas y lípidos y cuya identificación en la célula diana suele ser mediada habitualmente por un receptor.

En contraste con esta bioquímica dirigida y altamente organizada, es conocido que también intervienen en la respuesta inflamatoria pequeñas moléculas reactivas, derivadas del oxígeno molecular, con escasa o nula especificidad diana.

A estos intermediarios reactivos del metabolismo del oxígeno se les denomina "radicales libres" si poseen uno o más electrones impares.

Se puede definir, pues, un radical libre, como cualquier molécula o átomo que tiene en su última capa uno o más electrones

desapareados (es decir, un número impar)²¹⁶.

Varias de las células participantes en la inflamación del asma pueden producir oxígenos reactivos. Los neutrófilos pueden producirlos en forma de radical superóxido, demostrándose en estudios recientes una mayor cantidad de este mediador en sujetos asmáticos en relación a controles normales, así como su relación indirecta con parámetros funcionales y directa con el progreso de la enfermedad y su duración. Por este motivo se ha sugerido que estos oxígenos reactivos pueden modular la inflamación de las vías respiratorias²¹⁷.

Otras células, como mastocitos, macrófagos y eosinófilos también pueden producirlos. Así, se ha demostrado en pacientes asmáticos una mayor liberación de superóxido en macrófagos alveolares y eosinófilos, y la formación de ácidos hipohalogenados en el caso de los eosinófilos y neutrófilos (por interacción respectivamente de la peroxidasa eosinofílica y la mieloperoxidasa neutrofílica con el H₂O₂), que es posible que contribuyan a la lesión tisular. Se ha sugerido que los radicales de oxígeno provocan broncoconstricción y secreción de moco, y que afectan a la sensibilidad y vascularización de las vías respiratorias²¹⁸.

Pese a lo anterior, no se ha evidenciado de forma concluyente una contribución primaria de los radicales oxígeno a la fisiopatología del asma, ni su modificación con tratamiento antioxidante.

I.10.EFECTOS DE LOS CORTICOIDES EN LA INFLAMACION.

I.10.1.Efectos sobre la producción de células inflamatorias.

La administración oral o intravenosa de glucocorticoides produce cambios importantes en el número de leucocitos circulantes. Así, se ha observado una disminución de los basófilos, eosinófilos y monocitos a un 20% aproximadamente, de la cantidad normal circulante de cada uno de ellos. También disminuye el número de linfocitos circulantes, aunque no de un modo tan drástico. Concretamente, respecto a las células T, los esteroides producen una disminución del número de células cooperadoras (CD4), aunque no de las citotóxicas-supresoras (CD8). La cantidad de células "natural killer"(NK), no se ve influenciada por su administración aguda²¹⁹.

Entre las 4 y 6 horas se producen cambios en la cifra de leucocitos, que disminuyen entre las 24 y las 48 horas siguientes a la administración de una dosis única de esteroides. Al contrario de lo que sucede con los basófilos, eosinófilos y monocitos, la administración de esteroides aumenta el número de neutrófilos circulantes. Este aumento de neutrófilos se debe al efecto combinado de la disminución de salida de estas células de la sangre, la disminución del conjunto de granulocitos marginales de depósito y el aumento de la producción de neutrófilos por la médula ósea. Este último puede ser uno de los efectos más importantes, ya que el tratamiento con esteroides en pacientes con función medular deteriorada produce un pequeño aumento del nivel de neutrófilos circulantes. Sin embargo, la disminución del tamaño del depósito de granulocitos marginales podría ser de sustancial importancia, ya que los niveles de fosfatasa alcalina

de los neutrófilos (un marcador de su madurez) indica que una gran proporción de los neutrófilos adicionales presentes en la sangre tras la administración de esteroides son células maduras. In vitro se aprecia un efecto esteroideo selectivo sobre la proliferación de eosinófilos y neutrófilos en cultivos de médula ósea humana; el tratamiento con esteroides inhibe la formación de colonias de eosinófilos, pero aumenta la formación de colonias de neutrófilos en cultivos²¹⁹. Estudios in vivo e in vitro han demostrado un efecto generalizado de los esteroides consistente en la reducción de la liberación de factores que estimulan la granulopoyesis o la formación de colonias (CSF)²²⁰.

Sin embargo, es probable que la disminución de eosinófilos en sangre tras la corticoterapia no se deba sólo a la disminución de la producción en la médula ósea; hay estudios con eosinófilos marcados con isótopos que indican que su vida media y su tiempo de tránsito son relativamente prolongados. Estos estudios permiten concluir que la reducción del número de eosinófilos por la corticoterapia puede provenir del secuestro reversible de eosinófilos por los tejidos²¹⁹.

Con respecto a los efectos sobre los basófilos, los mecanismos que producen su reducción aún no están perfectamente definidos. La vida media de los basófilos (al igual que ocurre con los eosinófilos) es lo suficientemente larga como para afirmar que el tratamiento esteroideo reduce el número de basófilos circulantes sólo por un descenso de la producción medular. Es posible que la reducción se deba al secuestro de estas células en determinados lechos vasculares²¹⁹. Cabe destacar, además, que el tratamiento prolongado con esteroides en pacientes asmáticos

o con enfermedades vasculares del colágeno no se asocia a una reducción crónica del nivel de basófilos circulantes²²¹.

Los efectos sobre el número de mastocitos son menos conocidos. Hay estudios que han demostrado una reducción del número de mastocitos en biopsias bronquiales de pacientes asmáticos, tras tratamiento esteroideo. En otros, el tratamiento tópico en las fosas nasales no tuvo efectos sobre el número de mastocitos locales²²² (observados por biopsias nasales), sin embargo sí se redujo la cantidad de histamina en las biopsias, lo que sugiere una reducción del contenido de histamina en los mastocitos de estos tejidos. En raspados nasales (que sólo contienen mastocitos de la mucosa, en oposición a los mastocitos del tejido conjuntivo presentes en biopsias nasales y bronquiales), sí se induce con tratamiento esteroideo un descenso neto del número de mastocitos, así como de la cantidad de histamina⁶⁴.

I.10.2.Efectos sobre la función de las células inflamatorias.

-Linfocitos:

Ya hemos indicado el efecto reductor en sus niveles totales. Sin embargo sus efectos sobre los niveles totales de inmunoglobulinas son relativamente escasos, produciendo sólo a altas dosis una leve disminución de los niveles de IgG e IgM, y un moderado aumento de los niveles de IgE²¹⁹.

Por otro lado, la corticoterapia es especialmente eficaz en la inhibición de las reacciones de hipersensibilidad tardía, como la prueba de la tuberculina. Esto se debe sobre todo a la inhibición de la migración de los linfocitos al sitio de estimulación antigénica, y de los factores de crecimiento y

activadores de los mismos (IL-1, IL-2 e interferón-gamma)²²³.

Los glucocorticoides modifican la expresión de los receptores de inmunoglobulinas (para IgG ó IgE) sobre las células linfoides, a través de la reducción ya indicada de los niveles de las interleucinas (sobre todo de interferón gamma).

-Macrófagos y monocitos.

Los monocitos son extraordinariamente sensibles a los esteroides, reduciéndose no sólo el número de monocitos circulantes, sino también el porcentaje de portadores de receptores de baja afinidad para la IgE.

Por otro lado el tratamiento con esteroides inhibe la liberación de secretagogos de moco derivados de los macrófagos, lo que, tal vez contribuya a la reducción de la secreción de moco en las vías aéreas de los pacientes asmáticos²¹⁹.

Los esteroides también inhiben la liberación de monoquinas como la IL1 y TNF (responsables de la emigración leucocitaria durante la fase tardía de las reacciones alérgicas), pudiendo reducir de esta forma el secuestro celular en el sitio de la inflamación²²⁴.

-Neutrófilos y eosinófilos.

El efecto más importante de los esteroides sobre estas células en las enfermedades alérgica, es su capacidad de inhibir su acumulación en los sitios donde se concentran. Los neutrófilos procedentes de individuos normales tratados con esteroides presentan una respuesta quimiotáctica indemne y capacidad de liberar enzimas tanto de los gránulos específicos como de los azurófilos²²⁵. La activación neutrofílica, pues, no parece un efector directo importante de la acción glucocorticocidea en el hombre.

Por el contrario, la quimiotaxis y la adherencia a una superficie artificial de los eosinófilos disminuye tras el tratamiento esteroideo in vivo²²⁶. No se sabe si los eosinófilos que permanecen en la circulación tras la administración aguda de esteroides son representativos del depósito total de eosinófilos o si el tratamiento esteroideo ha seleccionado una subclase quimiotácticamente menos activa de eosinófilos circulantes²¹⁹. Ya hemos indicado, al estudiar al eosinófilo, el efecto de los esteroides, demostrado de forma más reciente, sobre su activación y subsiguiente liberación de mediadores de sus gránulos.

-Mastocitos y basófilos.

Los mastocitos parecen ser insensibles a los corticoides, no habiendo efectos destacables sobre ellos en exposiciones in vivo e in vitro.

En contraste con los mastocitos, los basófilos humanos son sensibles a los glucocorticoides in vitro, observándose una notable inhibición de la liberación de histamina y leucotrieno, tras incubar basófilos humanos durante 24 horas con esteroides²²⁶. Por el contrario, el tratamiento de sujetos normales con esteroides no reduce la liberación de histamina, a pesar de la notable disminución del número de basófilos circulantes. Del mismo modo, los pacientes que reciben un tratamiento prolongado por enfermedades alérgica o enfermedades vasculares del colágeno, tienen niveles normales de basófilos circulantes, que liberan histamina por un estímulo dependiente de la IgE. Sin embargo, los basófilos circulantes de los pacientes sometidos a corticoterapia crónica son mucho menos reactivos a los efectos de los esteroides in vitro sobre la

liberación de mediadores, quizá porque la corticoterapia elimina de la circulación los basófilos sensibles a los esteroides, dejando una subpoblación relativamente resistente su efecto inhibidor²²¹.

Es posible que los principales efectos de los esteroides sobre mastocitos y basófilos se relacione con la dinámica de este tipo de células en los tejidos. En general, su administración oral o parenteral tiene escaso efecto sobre el número de mastocitos cutáneos o hísticos (mastocitos "típicos" o "del tejido conjuntivo"), y sin embargo, los esteroides tópicos reducen claramente el número de mastocitos de la capa mucosa en y sobre la superficie nasal⁶⁴.

I.10.3.Efectos en el asma bronquial.

Desde hace años se ha reconocido la eficacia de los esteroides en el tratamiento del asma. Así, se sabe que este tratamiento mejora la función pulmonar de los pacientes asmáticos en horas o, en algunos casos, días después de la instauración del tratamiento. En muchos casos (aunque no en todos) se ha demostrado que el tratamiento oral con esteroides durante días o semanas no produce efectos sobre la reacción inmediata a la inhalación de un antígeno, mientras que disminuye o erradica por completo la fase tardía de la respuesta pulmonar²²⁷. Por el contrario, la aplicación tópica de esteroides, como budesonida o dipropionato de beclometasona, durante 2 a 4 semanas disminuye la respuesta aguda y la tardía²²⁸. Las aplicaciones tópicas durante periodos breves (vgr menos de un día) no tienen efecto sobre la respuesta aguda, pero bloquean la respuesta tardía²²⁹.

En cuanto a los efectos de los esteroides sobre la hiperreactividad bronquial (HRB), aunque en algunos trabajos no se han demostrado²³⁰, en la mayoría se ha observado una reducción moderada de la misma^{231,232}. Sin embargo, estos experimentos se han realizado habitualmente en pacientes que no presentaban hiperreactividad severa ó asma bronquial grave. En este sentido se ha indicado que el dipropionato de beclometasona inhalado es más eficaz que la prednisolona oral para reducir la HRB basal, lo que apunta la acción local de los esteroides sobre la mucosa respiratoria²³³.

Dado que, la inflamación de las vías aéreas es un factor fundamental en la sintomatología del asma, la acción antiinflamatoria de los esteroides es clave. Así, los efectos que producen, pueden resumirse esquemáticamente en:

1) Inhibición de la secreción de los factores de crecimiento y de otros mediadores. Ya han sido referido los efectos inhibitorios sobre los factores responsables de la proliferación de células como linfocitos, eosinófilos, mastocitos ect. No inhiben la liberación de mediadores de neutrófilos humanos o mastocitos, y se supone que no tienen efecto sobre la función plaquetaria, ya que se trata de células anucleadas.

Inhiben, además la secreción mucosa de las vías aéreas, por efecto tanto directo, como mediante la reducción de la cantidad de secretagogos de moco presentes en la vía aérea.

2) Inhibición de la liberación de metabolitos del ácido araquidónico y de PAF.

3) Inhibición de la acumulación de leucocitos en el tejido pulmonar. Probablemente, por reducción de la liberación de

factores que los atraen.

4) Sinergismo o efectos permisivos sobre las respuestas adrenérgicas. La reversión de la baja sensibilidad a las catecolaminas mediante el tratamiento con esteroides tiene gran importancia en la terapéutica del asma cuando se emplean beta agonistas, y también puede ser importante en la eficacia de los esteroides sólo, en la medida en que las catecolaminas endógenas regulan la función de las vías aéreas.

5) Disminución de la permeabilidad vascular. La reducción del edema asociado a la inflamación de las vías aéreas se debe a efectos directos sobre las respuestas de permeabilidad vascular, a la disminución de factores que inducen la permeabilidad capilar y a la reducción de la acumulación de leucocitos²¹⁹.

I.11. LA RINITIS ALERGICA.

I.11.1. RELACION CON ASMA BRONQUIAL.

Si bien se ha constatado que un número significativo de pacientes asmáticos tienen rinitis alérgica, existen pocas pruebas que apoyen que la rinitis alérgica predispone al desarrollo de asma. En un estudio epidemiológico realizado en Tecumseh (Michigan), se observó una incidencia de asma en sólo el 1% de pacientes con rinitis alérgica, tras un periodo de seguimiento de 4 años²³⁴. Así, aunque no se considera que el asma sea una complicación de una forma más grave de rinitis alérgica, algunos individuos con rinitis alérgica tienen HRB sintomática²³⁵ (más aún en la estación polínica²³⁶), y desarrollarán posteriormente asma²³⁷. Estudios realizados con pruebas de provocación bronquial con antígeno de ambrosía han demostrado que existe una relación importante entre el grado de reactividad de las vías aéreas inferiores de los pacientes con asma por ambrosía y el de los pacientes afectados de rinitis alérgica a la ambrosía²³⁸.

Además, se ha comprobado que varios tipos de estimulación irritativa, mecánica, eléctrica e infecciosa de las membranas mucosas nasales inducen cambios mensurables a nivel de las vías aéreas inferiores²³⁹. Los pacientes con poliposis nasales tienen una probabilidad del 25% al 30% de desarrollar asma bronquial²⁴⁰. Por último se ha indicado que el tratamiento de la rinitis alérgica con corticoides vía nasal tiende a producir una mejoría en la gravedad clínica del asma²⁴¹.

I.11.2.RINITIS ALERGICA E INFLAMACION.

La importancia de los fenómenos inflamatorios en la patogenia y manifestaciones clínicas de la rinitis alérgica parece similar que para el asma bronquial.

Ante un estímulo antigénico desencadenante, se ponen en marcha los múltiples mensajeros, células y mediadores implicados en la inflamación de la mucosa nasal.

Para el estudio de estas células y mediadores participantes se utilizan habitualmente diversas técnicas de obtención de las muestras. Así, se pueden obtener muestras como resultado de sonarse la nariz (secreciones), de raspados (epitelio superficial y a veces secreciones), de biopsias (mucosa y submucosa nasal), o bien los lavados nasales utilizados más recientemente para la cuantificación de los diversos mediadores²⁴².

I.11.2.1 Estudios citológicos.

El contenido celular de la mucosa nasal normal de lactantes, niños y adultos está constituido por numerosas células epiteliales, entre ellas células columnares ciliadas y no ciliadas, caliciformes y basales. Normalmente no se encuentran células eosinofílicas ni basofílicas; sin embargo sí pueden observarse algunos neutrófilos y bacterias²⁴³.

Los pacientes con enfermedad nasal crónica secundaria a una rinitis no inflamatoria o estructural tienen un citograma normal, a menos que coexistan varios mecanismos.

La enfermedad nasal alérgica activa cursa con aumento del número de eosinófilos²⁴³. En estudiantes universitarios, escolares y lactantes se ha demostrado que existe una correlación muy

significativa entre la eosinofilia de las secreciones y manifestaciones de alergia tales como frotamiento de la nariz, estornudos, aspiraciones, hidrorrea y cornetas húmedos e inflamados. Asimismo, a los 30 minutos de una prueba de provocación nasal con alérgeno positiva se producen aumentos significativos de la eosinofilia en las secreciones nasales²⁴².

Por otro lado, el grado de eosinofilia parece que se relaciona con la magnitud de la exposición alérgica y los síntomas, y se han descrito disminuciones significativas de las cifras de eosinófilos tras la mejoría de los síntomas producida por el tratamiento tópico nasal con beclometasona²⁴⁴, o más recientemente con fluticasona²⁴⁵.

También se han observado en la rinitis alérgica incrementos del número de basófilos, mastocitos y células caliciformes en el epitelio y secreciones nasales.

Las células basofílicas (grandes-mastocitos, pequeñas-basófilos) se ha comprobado que son biológicamente activas en la alergia, siendo los leucocitos basófilos los que constituyen la mayor parte de estas células basofílicas en los raspados mucosos y en las secreciones nasales²⁴². Sin embargo, se ha constatado que el tejido de la mucosa nasal de pacientes con rinitis alérgica contiene un número sustancialmente mayor de mastocitos de mucosa que los controles no alérgicos^{64,222}. Esto se relaciona en parte con un mayor número de precursores de mastocitos hallados en la circulación de sujetos alérgicos y también con una producción local de factores de crecimiento de los mastocitos en la mucosa nasal²¹⁹. A medida que aumenta la cantidad de células basofílicas, los síntomas nasales se agravan y las respuestas a las pruebas

de provocación se hacen más intensas. Es frecuente, además, que el número de estas células aumente en las secreciones nasales de pacientes con rinitis polínica durante primavera y disminuya cuando ha pasado la estación, así como después de una inmunoterapia eficaz o de un tratamiento nasal tópico con corticoides^{242,245}.

Todo lo anterior sugiere que la aparición de las células basofílicas en las secreciones nasales está relacionada con el papel que desempeñan en la alergia nasal. En la rinitis alérgica, además, se ha correlacionado el número de basófilos con la eosinofilia nasal²⁴⁶.

En los pacientes con rinitis crónica se observa una cantidad de células caliciformes significativamente mayor en los raspados de mucosa que en los individuos normales y, tanto en la rinitis crónica como en la estacional, se ha observado una correlación significativa entre el aumento de las células caliciformes y la eosinofilia de las secreciones²⁴².

El número de neutrófilos aumenta en casos de infección bacteriana, así como después de la exposición a algunos agentes irritativos o productos químicos, y en la fase tardía de la reacción a estímulos antigénicos²⁴².

I.11.2.2. Mediadores de la inflamación en lavados nasales. Efecto del tratamiento con corticoides.

El lavado de la cavidad nasal tras la estimulación antigénica en los sujetos alérgicos muestra un incremento de los niveles de glucoproteínas, prostaglandinas D₂, leucotrieno C₄, cinina y TA Me-esterasa, una proteasa de actividad inespecífica. En los

sujetos no alérgicos, estimulados con el mismo antígeno no se observan estos mediadores y tampoco presentan síntomas²¹⁹.

Los sujetos alérgicos estimulados presentan una segunda liberación de mediadores en la fase tardía de la reacción, en la que todos los mediadores antes señalados, a excepción de la prostaglandina D₂, están elevados en las secreciones nasales²⁴⁷.

Un gran número de neutrófilos y eosinófilos y un significativo número de basófilos infiltran la cavidad nasal durante esta fase tardía²⁴⁸, por lo que la reaparición de los síntomas y la liberación de mediadores es probable que se relacione con este infiltrado celular.

Por otro lado, el mecanismo de acción de los glucocorticoides en la rinitis se ha estudiado en experimentos que revelaron diferencias entre su administración tópica u oral^{219,249}. En este sentido, al igual que se indicó en el asma bronquial, el pretratamiento de dos días con esteroides orales antes de un estímulo antigénico no demostró inhibición de la fase aguda de la respuesta al estímulo, y sí una inhibición casi completa de la fase tardía. Así pues, el tratamiento esteroideo oral no inhibe la aparición de mediadores, sobre todo de los producidos por los mastocitos (como la histamina y la prostagandina D₂) durante la fase aguda de la respuesta, mientras que inhibe completamente la aparición de mediadores en la fase tardía y reduce la respuesta de impronta medida por la liberación de éstos, así como los síntomas²⁴⁹. Mientras tanto, el tratamiento con esteroides de uso tópico (durante una semana o más) sí inhibe la fase aguda, como puede deducirse de la evolución sintomática y de mediadores. Como ocurre con el tratamiento esteroideo oral,

los esteroides de uso tópico también inhiben los síntomas de la fase tardía, la liberación de mediadores y la impronta²¹⁹.

Con respecto al infiltrado celular, tanto los esteroides tópicos como los orales, disminuyen la entrada de leucocitos en la cavidad nasal²⁴⁸. Cabe destacar que este efecto de los esteroides es más importante si la aplicación es tópica, lo que parece apoyar la hipótesis de que los esteroides bloquean la acumulación celular, inhibiendo la producción local de factores que intervienen en el secuestro leucocitario.

Por otro lado, entre los diversos mediadores liberados por los eosinófilos, que pueden ser evaluados en muestras obtenidas de lavados nasales, se ha puesto especial énfasis en los últimos años en la cuantificación de la MBP y ECP, y sus niveles tras tratamiento con corticoides tópicos.

Así, en los estudios realizados por Bascom y cols^{248,250} se apunta el incremento del número de eosinófilos y MBP tras provocación alérgica nasal y su inhibición cuando son pretratados con corticoides sistémicos.

Otros estudios muestran el incremento tanto de los niveles de ECP²⁵¹⁻²⁵⁹, como de otras sustancias (bradikinas, histamina, leucotrienos, triptasa, arilsulfatasa B²⁵¹⁻²⁵⁴), en lavados nasales de pacientes con rinitis polínica²⁵⁴, al ser estimados en primavera²⁵¹ ó tras provocación alérgica^{252,253,255-258}. En este sentido, Bisgaard y cols²⁵⁶ señalan la elevación de los niveles de ECP a las 6, 8, 10, y 24 horas de la provocación alérgica en los pacientes tratados previamente con placebo, a diferencia de los tratados con budesonida vía nasal, en los que no hay este incremento, existiendo diferencias significativas entre ambos

grupos.

En diversos estudios se demuestra, asimismo, el descenso significativo de los niveles de ECP (estimados en lavados nasales y en primavera) en riniticos polínicos tratados con corticoides via nasal^{259,260}, aunque en el trabajo de Linder y cols²⁵⁹ no se aprecia la elevación estacional de estos niveles.

I.11.2.3. Eosinófilos y ECP en sangre.

Como se ha indicado, en los pacientes con rinitis y asma el número total de eosinófilos está elevado con respecto a los normales. Sin embargo este valor es bastante inferior en los pacientes sin asma y ligeramente superior en los pacientes sólo con rinitis en relación con el grupo control. Así, Mygind y cols.²⁶¹ evaluaron por un lado 100 personas normales (grupo control), 93 con rinitis crónica sin alergia demostrada, 45 con rinitis alérgica demostrada y 55 con rinitis y asma bronquial, encontrando valores medios de 225 eosinófilos/mm³ en el grupo de rinitis alérgica y 143 eosinófilos/mm³ en el grupo control. Por este motivo parece que el recuento de eosinófilos en sangre periférica probablemente sea de poca ayuda en la evaluación de los pacientes con rinitis.

Sin embargo, como en el caso del asma, sí podría tener mayor validez, el recuento en suero de los mediadores liberados por estos eosinófilos, como índice de activación y respuesta al tratamiento antiinflamatorio.

Son pocos, hasta el momento actual, los trabajos que estudien estos niveles séricos. Satoh y cols²⁵⁴., obtienen clara correlación entre los niveles de ECP en lavados nasales y la

severidad clínica y ligera tendencia entre esta sintomatología y los niveles séricos de ECP. Además, describen la correlación entre la ECP y el número de eosinófilos en sangre. En un estudio posterior Beppu y cols²⁶², evalúan a 28 rinitis alérgicos, demostrando niveles significativamente superiores de las cifras de eosinófilos y de ECP (en relación al grupo control), tanto en suero como en lavados nasales. En este mismo estudio, sin embargo, no se describe correlación entre los niveles de ECP y la cifra de eosinófilos séricos.

Por último, Jong y cols²⁶³ tras estudiar a 112 pacientes con rinitis alérgica, indican la existencia de esta correlación cuando la cifra de eosinófilos es alta pero no cuando es baja.

JUSTIFICACION-OBJETIVOS

II.1.JUSTIFICACION DEL TRABAJO

Dado que los niveles de Proteína Catiónica del Eosinófilo (ECP) pueden ser indicadores del grado de activación de los eosinófilos, y marcadores de la inflamación y su intensidad en el asma bronquial o rinitis alérgica, consideramos necesario su estudio en nuestra población (sanos y pacientes) para establecer los niveles de normalidad y patológicos. En este sentido, no existen aún trabajos en nuestro medio que cuantifiquen directamente estos niveles en suero.

Por otro lado, planteada la hipótesis de que los niveles de ECP puedan elevarse antes de que se inicie la exacerbación del asma y desciendan tras tratamiento correcto, creemos que puede ser importante establecer su utilidad para comprobar la eficacia del tratamiento antiinflamatorio propuesto, así como herramienta en la predicción de un empeoramiento de la clínica del paciente.

Existen pocos trabajos que realicen este estudio en suero con una población amplia, y ninguno que acometa ambas patologías (asma bronquial-rinitis alérgicas) y que investigue ambos aspectos: la utilización de estos niveles en sangre como potencial forma de monitorizar la respuesta al tratamiento y actividad de estas enfermedades.

II.2.OBJETIVOS

Así pues, nos planteamos como objetivos concretos:

1) Analizar los niveles de ECP en un grupo de población normal, sin antecedentes de síntomas respiratorios o riníticos (grupo control), y en pacientes con asma bronquial y/o rinitis alérgica, según los distintos grados de severidad clínica y situación atópica. Comprobaremos si existen diferencias en los valores de ECP séricos en los distintos grupos estudiados.

2) Establecer si los niveles en suero de ECP pueden predecir un deterioro del asma.

3) Evaluar la evolución de los niveles séricos de ECP tras tratamiento con corticoides inhalados, orales o vía nasal en ambos grupos de pacientes (asmáticos y riníticos), estableciendo si tras la terapia existe descenso significativo de estos valores.

Como objetivos secundarios estudiaremos la posible asociación entre ECP y atopia, realizaremos controles de calidad de la técnica de determinación, evaluando, de forma paralela, la estabilidad de los eosinófilos y la ECP a distintas temperaturas y tiempos de congelación.

MATERIAL Y METODOS

Para alcanzar nuestros objetivos se diseñó un estudio de casos-
controles, realizado desde los meses de noviembre de 1993 a julio
de 1994, con un primer periodo de inclusión de pacientes hasta
febrero de 1994 y posterior seguimiento hasta la finalización del
mismo. El tiempo medio de seguimiento de los pacientes fue de
162±43, con rango de 60-215 días.

III.1. POBLACION

Fueron incluidos en el estudio un total de 139 personas,
divididas en dos grupos principales: un grupo control de 53
individuos sanos de la población general, de edad media 32±7
años, sin antecedentes de atopia, en los que se previamente se
descartó mediante interrogatorio la existencia de sintomatología
asmática o rinitica actual o pasada; y un grupo de 86 pacientes
consecutivos de edad media 29±13 años, diagnosticados en nuestro
servicio de asma bronquial (N=69) o rinitis alérgica, sin ninguna
sintomatología bronquial añadida (N=17).

La presencia de asma fue definida siguiendo los criterios de la
American Thoracic Society (ATS)²⁶⁴, exigiéndose en todos los
pacientes la constatación de obstrucción reversible de la vía
aérea por un test broncodilatador positivo (incremento de al
menos un 15% del FEV1 tras la inhalación de 200 µg de
salbutamol), o un test de broncoprovocación con metacolina
positivo, siguiendo la metodología que expondremos con
posterioridad.

El diagnóstico de rinitis alérgica fue definido por la presencia
de sintomatología compatible (estornudos, secreción acuosa y
taponamiento nasal), de presentación estacional, exigiéndose en

todos los casos tests cutáneos positivos al menos a uno de los alergenos probados.

En ambos grupos fueron descartadas previamente otras patologías respiratorias o generales asociadas mediante una historia clínica completa, radiografía de tórax y analítica general normales, además de una exploración funcional en la que no hubiera alteraciones, a no ser las propias de la obstrucción reversible. Se recogió el hábito tabáquico actual o pasado, así como el número de cigarrillos, y los antecedentes familiares de asma o rinitis alérgica de todos los pacientes.

Los criterios de exclusión, así como las características de la población quedan reflejados en las tablas 4 y 5.

CRITERIOS DE EXCLUSION:

- Pacientes con asma corticodependiente, que tomen de forma continuada corticoides vía oral*
- Pacientes con enfermedad endocrina, autoinmune o vasculitis.
- Pacientes con patología cardíaca o digestiva que justifique los síntomas respiratorios.
- Pacientes con EPOC, patología intersticial pulmonar, bronquiectasias, fibrosis quística u otras enfermedades respiratorias.
- Pacientes con síntomas respiratorios causados por patología neuromuscular.
- Mujeres embarazadas o durante la lactancia-
- Pacientes diagnosticados de Dermatitis Atópica.
- Pacientes que no sean capaces de cumplir el tratamiento y someterse al seguimiento.

***En el grupo de pacientes "graves", no es criterio de exclusión la corticoterapia continua vía inhalatoria.**

TABLA 4

TABLA 5
Características de los pacientes

	asmáticos	riníticos
n°	69	17
edad	29 ± 13	32 ± 7
sexo	v=30,h=39	v=9,h=8
fumadores*	13(19%)	2(12%)
exfumadores*	9(13%)	0
n° cigarrillos	14 ± 16	5
a.familiares**	31(45%)	9(53%)

*número y porcentaje respecto al total (entre paréntesis).

**antecedentes familiares de atopia; número y porcentaje respecto al total.

III.2. EVALUACION CLINICA.

En el grupo de pacientes asmáticos se estableció la gravedad clínica mediante dos métodos:

- 1) el propuesto por Aas⁵² (AAS SCORE), que indica 5 grados de severidad teniendo en cuenta la sintomatología y la medicación recibida en el último año (tabla 6); y
- 2) según los criterios clínicos y funcionales establecidos en el último Consenso Internacional de diagnóstico y tratamiento del asma⁷, que tienen en cuenta la sintomatología y la exploración funcional efectuada en el momento de la revisión, con lo que se estimó la severidad clínica en tres grados: asma leve, moderada o grave (tabla 7).

Una vez incluidos en los distintos protocolos de tratamiento que expondremos con posterioridad, se evaluó nuevamente la situación clínica de los pacientes, siendo puntuados con 1, 2, ó 3, según hubiera respectivamente mejoría, igualdad o empeoramiento de los síntomas. Con ésto obtuvimos índices numéricos de evolución clínica.

TABLA 6

AAS SCORE

1. Menos de 5 episodios por año con menos de 7 días de duración de síntomas y limitación funcional y largo intervalo libre de síntomas con función pulmonar aparentemente normal*.
 2. De 5 a 10 episodios por año con menos de 7 días de duración de síntomas y limitación funcional y largo intervalo libre de síntomas con función pulmonar aparentemente normal*.
 3. Más de 10 episodios por año con menos de 7 días de duración de síntomas y limitación funcional y largo intervalo libre de síntomas con función pulmonar aparentemente normal, o más periodos prolongados (completando 12 semanas o más por año) con obstrucción bronquial sintomática o aparente deterioro de función pulmonar*.
 4. Más de 5 episodios por año con obstrucción prolongada (completando 6 meses o más por año) más episodios seguidos u obstrucción crónica sintomática con limitación de la función.
Asma bronquial que necesita establecimiento de tratamiento y/o uso continuo de medicación esteroidea (cualquiera de las dos formas) para clasificarlo en grado III o mejor*.
 5. Asma severa crónica incapacitante, exacerbaciones agudas a pesar de la continua medicación seguida adecuada y con régimen de dosificación sensato.
-

*Si el paciente tiene síntomas y signos de más prolongada obstrucción bronquial (incluida obstrucción subclínica), es permitido el inmediato grado superior.

*El asma inducida por el ejercicio es excluida siempre que la recuperación es completa con reposo y/o una única dosis de broncodilatador.

*Los pacientes que usan broncodilatadores para prevenir o aliviar la obstrucción bronquial, pertenecen al grado de severidad correspondiente a la cantidad y la duración de la medicación usada y el estado más probable que tendría sin medicación.

TABLA 7

Gravedad clínica, según el Ultimo Consenso Internacional de diagnóstico y tratamiento del asma

ASMA LEVE	ASMA MODERADA	ASMA GRAVE
<p>-Síntomas breves e intermitentes <1-2 veces por semana.</p> <p>-Asma nocturno <1-2 veces al mes.</p> <p>-Asintomático entre crisis.</p> <p>-FEM ó VEMS: .>80% predicho</p> <p>.Variabilidad <20%</p>	<p>-Exacerbaciones >1-2 veces por semana.</p> <p>-La exacerbación puede afectar la actividad y sueño.</p> <p>-Síntomas nocturnos >2 por mes.</p> <p>-Síntomas crónicos que requieren uso casi diario de β_2 de corta duración.</p> <p>-FEM ó VEMS: .60-80% del predicho</p> <p>.Variabilidad 20-30%.</p>	<p>-Exacerbaciones frecuentes.</p> <p>-Síntomas continuos.</p> <p>-Síntomas nocturnos frecuentes.</p> <p>-Actividad física limitada.</p> <p>-FEM ó VEMS: .<60% del predicho.</p> <p>.Variabilidad <30%.</p>

FEM:Flujo espiratorio máximo.

VEMS: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo.

III.3. PRUEBAS DE ALERGIA.

Se estableció la presencia de atopia mediante la realización de tests cutáneos, por el método del Prick²⁶⁵, a los alergenos comunes en nuestro medio (tabla 8) (Lab. Abelló Madrid). Se utilizó control positivo de hidrocioruro de histamina, a una concentración de 10 mg/cc y control negativo de suero salino. Los extractos utilizados fueron del tipo glicerinado al 50% y conservados en fenol, estandarizados en Unidades Biológicas (BU) Brighton. Tras la punción y depósito del extracto se efectuó la lectura del test transcurridos 20 minutos desde su aplicación, siendo medido el habón y no el eritema para evaluar la respuesta. Se consideró como positivos sólo los habones ≥ 16 mm² de área.

Asímismo, se determinaron los valores de IgE total y específica a los mismos alergenos por el método de ELISA.

Según los resultados de los tests cutáneos, los valores de IgE específica y las características estacionales de la sintomatología, se dividió a los pacientes en asmáticos y riníticos con sensibilidad a ácaros (AA,RA), pólenes (AP,RP), mixtos (ácaros+pólenes, AMI, RM) y por último asmáticos intrínsecos(AI), cuando existían repetidos tests negativos y contexto clínico compatible.

TABLA 8

Alergenos testados en las pruebas cutáneas

Alergenos

Dermatophagoides pteronissimus

Grupos :

PI: Plátano

Llago

Sauce

Olmo

PII: Abedul

Fresno

Olivo

Encina

Acacia

PIII: Avena

Maíz

Centeno

Trigo

PIV: Dactilo

Cañuela

Ballico

Timotea

Poa

Gramma

Holco

PV: Artemisa

Parietaria

Llantén

Taraxacum

III.4. PRUEBAS DE FUNCION PULMONAR.

III.4.1. Se realizó el test de espirometría forzada basal mediante una unidad electrónica con transductor de presión diferencial y neumotacógrafo de tamices desechables para la detección analógica de flujos con interfase de conexión a ordenador PC compatible, aplicando los criterios de aceptabilidad de la ATS²⁶⁶ y SEPAR²⁶⁷. Se determinaron los porcentajes respecto al teórico (C.E.C.A), según edad, sexo y talla, para los parámetros FVC, FEV1, FEV1/FVC%, flujo espiratorio al 25-75%(MMEF) y Pico de flujo(PEF).

III.4.2. La presencia de hiperreactividad bronquial se determinó mediante test de provocación inespecífico con metacolina.

Fueron excluidos y pasaron a prueba broncodilatadora, aquellos pacientes que presentaron $FEV1 \leq 80\%$ del teórico, y/o $FEV1/FVC\% \leq 70$. Se realizó mediante nebulizador Devilbiss 35B, con un diámetro de partículas de 2-3 micras, siendo administradas inicialmente cinco inhalaciones de suero salino tamponado (con fenol al 0,04% de conservante), como diluyente. La espirometría se llevó a cabo en el plazo de 2 minutos tras suministrar el aerosol. Posteriormente fueron administrados, según la técnica de RR Rosenthal²⁶⁸, 5 inhalaciones (desde FRC hasta TLC), de concentraciones crecientes (0.025, 0.25, 2.5, 10 y 25 mg/cc) de metacolina, con las que se obtienen Unidades Inhalatorias (IU) acumuladas de metacolina (0.125, 1.375, 13.88, 63.88 y 188.88 Ui acumulativas), siendo realizada la espirometría a los 2 minutos tras cada dosis.

Se consideró test de metacolina positivo si tras cualquiera de las 5 dosis crecientes se producía una caída del 20% o más del FEV1, con respecto al obtenido tras la inhalación del diluyente, que se tomó como el 100%. Así fue determinado el valor de PD20, o sea, la dosis acumulada de metacolina (expresada en UI), que producía este descenso, calculado por interpolación lineal entre los dos puntos adyacentes.

Asímismo se calculó la pendiente de la curva dosis-respuesta, a través del índice estimado según el método de O'Connor²⁶⁹, modificado por Burrows²⁷⁰, siendo aplicada la fórmula :

$$\text{Log}(((\text{FEV1 inicial(tras diluyente)} - \text{FEV1 final(tras última dosis de metacolina)}) / \text{FEV1 inicial} \times 100) / \text{Log última dosis de metacolina en mg/dl}) + 10).$$

III.5. PRUEBAS DE LABORATORIO:

Las pruebas de laboratorio fueron realizadas antes que la prueba de provocación bronquial con metacolina o los tests cutáneos (estos dos en sesiones distintas).

III.5.1. Hemograma:

Se efectuó a todos los pacientes en cada una de las revisiones, realizándose conteaje de leucocitos, neutrófilos y eosinófilos (en $n^{\circ}/\mu l$).

III.5.2. Análisis de ECP.

III.5.2.1. Recogida de sangre y separación del suero.

A todos los participantes en el estudio les fueron extraídos 10cc de sangre venosa en Vacutainer SST (serum separating tubes, Becton Dickinson), siendo centrifugados (antes de transcurrida 1 hora de la extracción) para la separación del suero a 3900 rpm durante 10 minutos. El suero resultante fue dividido en alícuotas y congelado a -20° C.

El tiempo total empleado desde la recogida de la sangre hasta la congelación del suero no fue en ningún caso superior a los 140 minutos.

Para efectuar control de calidad de la técnica se recogieron de forma aleatoria alícuotas de suero que fueron congeladas a -70° C. Además, de las alícuotas congeladas a -20° C y extraídas del mismo suero, se realizaron determinaciones en diferentes plazos de tiempo (<15, 15-30, 30-60, 60-180 y 180-235 días). De esta forma se evaluó si la ECP se mantenía estable a -20° C con el tiempo, y si los eosinófilos seguían o no liberando mediadores. Para ello se estimó si existían diferencias significativas respecto a los

niveles basales en los distintos periodos evaluados.

III.5.2.2. Determinación de ECP.

Se realizó por la técnica de Fluoroimmunoensayo (Pharmacia CAP System ECP FEIA).

El fundamento del método es el siguiente:

-Los anticuerpos anti-ECP, unidos de forma covalente a los InmunoCAP (InmunoCAP Anti-ECP), reaccionan con la ECP total, contenida en la muestra de suero del paciente. Tras lavado, son añadidos nuevos anticuerpos anti-ECP marcados con una enzima, formando un complejo. Tras incubación, los restos de complejo anti-ECP-Enzima no unidos al InmunoCAP Anti-ECP son eliminados por nuevo lavado, mientras el complejo unido es incubado nuevamente con agente catalizador. Después de la inhibición de la reacción, la fluorescencia del producto resultante es medida en un Fluorocompteur (FluoroCount 96). Esta Fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de ECP en la muestra de suero.

Se determinaron en cada revisión al menos 2 alícuotas de suero por paciente, siendo establecido el coeficiente de variación de la técnica, así como las diferencias absolutas entre ambas determinaciones. El valor que era considerado era el medio de ambas mediciones.

Se detectaron valores de ECP séricos a partir de 2 $\mu\text{g/l}$.

III.6. SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES.

Se controló de forma mensual a los pacientes. En estas revisiones se realizó nueva evaluación clínica, una espirometría forzada con medición de los parámetros indicados, un hemograma con conteo de leucocitos, PMN y eosinófilos, y por último determinación de ECP. Estas determinaciones eran realizadas en cada paciente a la misma hora para evitar la influencia de las variaciones circadianas en los niveles de eosinófilos y ECP descritas en la literatura²⁷¹.

Se proporcionó un número de teléfono a todos los pacientes al que podían llamar cuando presentasen reagudización de sus síntomas. Si se producía tal circunstancia, eran revisados antes de transcurridas 24 horas, siendo realizados los análisis indicados (incluido obviamente nueva determinación de ECP), y nueva exploración funcional.

Si en cualquier momento del seguimiento esta sintomatología tenía duración o intensidad suficientes para ser considerada como asma moderada o grave, entraban en protocolo de tratamiento con corticoides inhalados u orales.

En el caso de los riniticos se iniciaba protocolo de tratamiento con corticoides tópicos vía nasal.

Un total de 3 pacientes fueron excluidos del estudio por abandonar el seguimiento. Dos pacientes más fueron apartados del estudio, uno por requerir ingreso hospitalario, y otro por ser detectada, durante su seguimiento, una hernia hiatal con reflujo gastroesofágico, considerándose que esta patología empeoraba su sintomatología respiratoria. Asimismo, no fueron incluidos en protocolo de tratamiento los pacientes que presentaron

reagudización de sus síntomas asmáticos asociada a proceso infeccioso concomitante de las vías respiratorias, definido el mismo como dolor faríngeo, síndrome febril y/o tos con expectoración purulenta en los días previos y durante la agudización.

Iniciaron y completaron el tratamiento 60 de los 81 pacientes evaluados (los 21 pacientes restantes eran asmáticos leves ó riníticos no sintomáticos durante el tiempo de seguimiento y pacientes con infección respiratoria concomitante). Estos 60 pacientes fueron divididos en cuatro grupos, según el tipo de sintomatología que presentaban, y por tanto, el protocolo de tratamiento en el que quedaban incluidos:

A) pacientes que presentaron durante el seguimiento síntomas bronquiales exclusivamente (N=16), que realizaron tratamiento con dipropionato de beclometasona (DPB) inhalada (con aerosol) a dosis de 1000 μ g/24 horas (2 inhalaciones de 250 μ g/12 horas);

B) pacientes con sintomatología exclusivamente rinítica (N=21), que realizaron tratamiento con Budesonida vía nasal a dosis de 200 μ g/ 24 horas (2 dosis de 50 μ g/12 horas);

C) pacientes con sintomatología asmática y rinítica (N=16), que efectuaron tratamiento combinado con DPB inhalada+Budesonida nasal a las dosis indicadas , y; D) pacientes con síntomas asmáticos graves (N=7) que, además de recibir DPB inhalada a dosis de 2000 μ g/ 24 horas, fueron tratados con pauta descendente de corticoides orales (Deflazacor; 30 mg/24 horas iniciales, con descenso de 7,5 mg cada semana y última semana a días alternos, completando un total de 4 semanas de terapia). Es de destacar que en este último grupo fueron incluidos 9 tratamientos, por

necesitar dos de los 7 pacientes una nueva pauta descendente de corticoides orales, que se inició después de 1 mes de finalizada la primera.

Los grupos establecidos se aprecian en la fig 2.

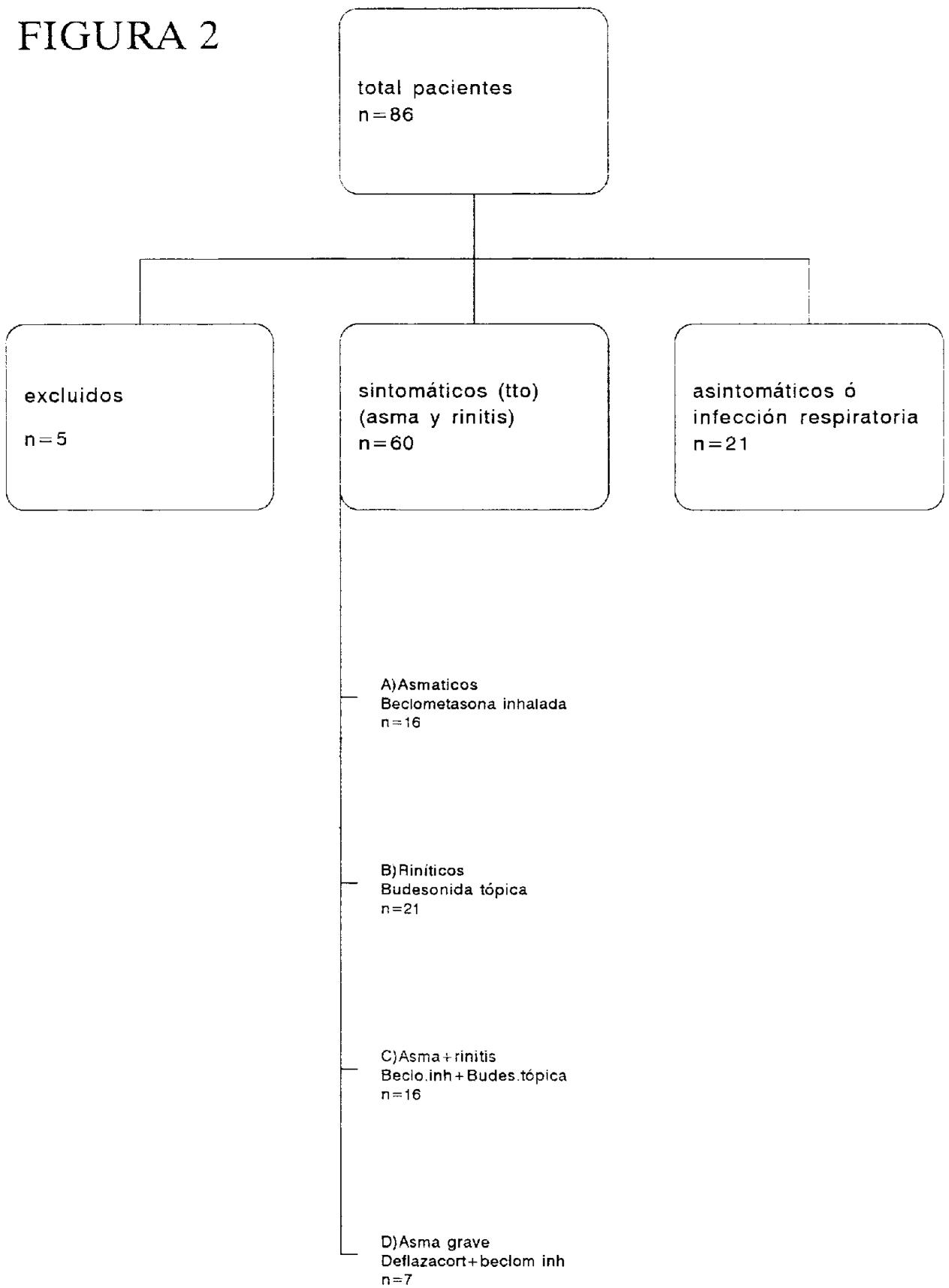
En los grupos A,B y C se realizó una determinación inicial (hemograma con conteo de eosinófilos, valores de ECP) antes del comienzo del tratamiento (nivel Basal) y otras dos, respectivamente, a los 21 y 60 días de seguimiento. En el grupo D, se efectuó además de la estimación basal, otra a los 30 días (una vez completada la pauta de corticoides orales). En los grupos de pacientes con síntomas asmáticos (A,C y D), se efectuó además espirometría forzada en cada una de las revisiones.

Se admitió en los asmáticos leves y moderados el tratamiento con β_2 agonistas inhalados de corta duración antes de la primera determinación de ECP (suspendidos con 24 horas de antelación), así como con antiinflamatorios inhalados (corticoides, nedocromil, cromoglicato), que debieron ser suspendidos al menos 1 mes antes de la misma.

En el grupo de asmáticos graves se admitió el tratamiento previo con β_2 agonistas, teofilinas y corticoides inhalados.

Los pacientes riniticos no habían recibido ningún tipo de tratamiento en al menos 1 mes previo a la determinación de ECP. Por último, ninguno de los pacientes participantes en el estudio había recibido tratamiento con corticoides por vía sistémica durante al menos un mes antes de la cuantificación, a excepción de un paciente incluido en el grupo de asmáticos graves que sí había recibido tratamiento con corticoides orales (deflazacor 30 mg al día en dosis descendentes) durante el mes previo a la

FIGURA 2



Grupos establecidos según la sintomatología y tratamiento realizado

primera determinación (en el caso de los asmáticos leves y moderados no lo habían recibido en los 3 meses previos).

Sólo los pacientes clasificados como leves se encontraban en situación clínica estable, no presentando, al ser incluidos en el estudio, antecedentes de exacerbación sintomática en los 5 meses previos a la extracción. El resto estaban en situación clínica inestable en el momento de la extracción.

Durante el seguimiento de los mismos hubo hasta un total de 26 pacientes clasificados como leves previamente que se inestabilizaron clínicamente entrando, pues, en protocolo de tratamiento.

Se permitió, en los pacientes que se reagudizaron durante el seguimiento (asma moderada), el tratamiento con β_2 agonistas de corta duración antes de entrar en protocolo de tratamiento.

En el caso de los riníticos sólo se encontraban sintomáticos 2 casos cuando se realizó la primera determinación de ECP.

Se definió, por último, la situación de predicción de reagudización sintomática cuando pudo demostrarse (en alguna de las revisiones efectuadas durante el tiempo de seguimiento), una elevación significativa de los niveles de ECP ($\geq 15\mu\text{g/dl}$), en un plazo previo menor de 1 semana a la reagudización de la sintomatología bronquial y/o rinítica, en pacientes estables con anterioridad. Además, los pacientes implicados debían tener previamente al menos una determinación de ECP dentro del rango de normalidad.

III.7. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD-ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA.

Se realizó este estudio para justificar la elección de los 15 $\mu\text{g}/\text{dl}$ como límite de normalidad (valor medio + 1DS), en relación a los 20 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (valor medio +2DS).

Así pues, en la primera revisión (1ª determinación), se definieron los términos de:

-verdadero positivo (VP): número de pacientes inestables clínicamente (asmáticos moderados o graves, siendo excluidos de este último grupo los que estaban en tratamiento previo con corticoides), que presentaron niveles de ECP mayores o iguales a 15 $\mu\text{g}/\text{l}$ (prueba positiva);

-falso negativo (FN) como el número de pacientes inestables clínicamente que presentaron niveles menores de 15 $\mu\text{g}/\text{l}$ (prueba negativa).

-verdadero negativo (VN) como el número de personas de la población control que presentaron cifras menores de 15 $\mu\text{g}/\text{l}$, y por último;

-falso positivo (FP) como el número de personas del grupo control que presentaron valores mayores o iguales de 15 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Igualmente se analizó considerando como límite superior de normalidad los 20 $\mu\text{g}/\text{l}$.

III.7. ANALISIS ESTADISTICO.

Los análisis estadísticos fueron realizados por los programas informáticos Epi-info versión 5.01 y Kwistat versión 3.0.

Se efectuó inicialmente una evaluación global de los valores medios en la primera determinación de ECP, de todos los grupos que hemos establecido (grupo control por un lado y grupo de pacientes por otro, con subdivisiones en este último según gravedad clínica y sensibilidad alérgica), mediante test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Con posterioridad se procedió al análisis por separado de cada uno de los grupos por el test no paramétrico de U Mann-Whitney, para establecer si existían diferencias significativas entre ellos y el grupo control.

Seguidamente, una vez estimada la evolución de los valores medios de ECP tras la realización de los distintos protocolos de tratamiento, se evaluó si existían diferencias significativas mediante el test de rangos de Wilcoxon.

Por otro lado se estableció la conexión (en tabla 2x2), de la ECP (positiva \geq de 15 μ g/dl, negativa menor de esta cifra), con los enfermos (y cada uno de los subgrupos establecidos), en relación con el grupo control. Se estimó así la razón de Ods Ratio (valores exactos y límites inferiores y superiores exactos al 95% de I. confianza) y la p por el test de Yates.

Para establecer las correlaciones numéricas lineales se utilizó el coeficiente de Pearson.

Consideramos con significación estadística a partir del valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

IV.1.DATOS DE LA PRIMERA REVISION.

IV.1.1. RESULTADOS DE PRUEBAS FUNCIONALES-PROVOCACION CON METACOLINA.

En la tabla 9 queda reflejada la situación funcional de ambos grupos de pacientes (asmáticos o riníticos), y según la gravedad clínica en los asmáticos. Como era de suponer los parámetros funcionales (FEV1%,PEF,MMEF) descendían a mayor gravedad, con función normal en los pacientes riníticos, prácticamente normal en asmáticos leves, poco alterada en los moderados y algo más afectada en los graves.

Se pudieron completar un total de 55 pruebas de provocación con metacolina. En el resto de los casos no se pudo realizar o completar por encontrarse el paciente sintomático, presentar espirometrías con FEV1 basal <80% y/o FEV1/FVC% <70% respecto al teórico, o caer el FEV1 tras diluyente $\geq 20\%$ respecto del FEV1 basal.

Los resultados de esta prueba de provocación reflejan un porcentaje de positividad mayor (como era de esperar) en el grupo de asmáticos (65%) que en los riníticos (13%), aunque con PD20 media paradójicamente en este último grupo menor (y por tanto teóricamente con "mayor hiperreactividad").

Sin embargo este dato carece de significación, dado los pocos pacientes con rinitis alérgica que presentaron metacolininas positivas.

En relación con la gravedad clínica, el porcentaje de metacolininas positivas fue mayor en los pacientes con asma moderado en los que fue posible su realización, que en los portadores de asma leve.

Los valores medios de PD20 fueron, asimismo menores en el grupo de asmáticos moderados que en los leves. En los asmáticos graves, como era lógico, no fue realizada la prueba.

IV.1.2.SITUACION CLINICA.

La severidad clínica de los asmáticos, según la gradación propuesta por AAS⁵²), mostró una distribución de 13 asmáticos con el grado 1º; 14 con el 2º; 28 con el 3º; 10 con el 4º; y por último 5 con el 5º grado de mayor severidad.

Es, pues, apreciable que la mayor parte de los pacientes presentaban grados intermedios o bajos de severidad clínica durante el año anterior a la revisión.

Cuando fueron establecidos los niveles de gravedad, según el Consenso Internacional⁷, obtuvimos un total de 44 pacientes con asma leve, 14 con asma moderado y 11 con asma grave.

IV.1.3. CELULARIDAD EN SANGRE PERIFERICA.

El número de leucocitos, polimorfonucleares y eosinófilos (tabla 10) fue mayor en los pacientes asmáticos que en los riniticos, aunque sin diferencias significativas.

Se apreciaron diferencias en la celularidad según la severidad clínica de los asmáticos, con incremento progresivo en el número de leucocitos y polimorfonucleares, según aumentaba esta gravedad. La cantidad de eosinófilos aumentó desde los asmáticos leves a los moderados, presentando valores similares, aunque con mayor dispersión, en los asmáticos graves.

Sin embargo, globalmente, valores absolutos mayores o iguales a $400/\mu\text{l}$ (o sea en rango de eosinofilia) sólo se dieron en 14

pacientes, lo que supone un 16% de todos los pacientes estudiados.

IV.1.4. SITUACION DE ATOPIA.

La IgE total fue mayor en pacientes asmáticos que en riniticos, aunque sin diferencias significativas (tabla 11).

Los tests cutáneos fueron positivos en un 81% de pacientes asmáticos y en el 100% de los riniticos (condición de inclusión).

Los porcentajes de positividades mayores se dieron para el alergeno olivo en los asmáticos, y para los grupos de pólenes III y IV en los riniticos. El tamaño medio de las pápulas (en los pacientes que presentaron tests cutáneos positivos) fue mayor para el *Dermatophagoides pteronissimus* (DP) en el grupo de asmáticos (tamaño medio $50 \pm 70 \text{mm}^2$), y para el grupo de pólenes III (PIII) en riniticos (tamaño medio $93 \pm 82 \text{mm}^2$)

En la tabla 12 queda reflejado el porcentaje de atópicos para cada grupo de gravedad evaluado, siendo destacable el número superior de polínicos en todos ellos grupos, a excepción de los asmáticos graves que eran mayoritariamente intrínsecos.

IV.1.5. NIVELES DE ECP.

IV.1.5.1. En la población control obtuvimos un valor medio de ECP de $9,34 \pm 5,76 \mu\text{g/l}$, mientras que en el grupo global de pacientes el valor medio de ECP fue de $17,59 \pm 16,85 \mu\text{g/l}$, tal como se aprecia en la tabla 13, donde se detallan además los valores de los dos grupos de pacientes (riníticos y asmáticos). Tanto para el grupo global de pacientes, como para los riníticos y asmáticos por separado, existían diferencias significativas en los valores medios de ECP con respecto al grupo control.

El coeficiente de variación de los valores de ECP fue del 12,5%.

IV.1.5.2. La distribución de los distintos valores según la edad fue uniforme (figuras 3 y 4).

Estimamos como límite superior de la normalidad los $15 \mu\text{g/l}$ (resultante de sumar 1 desviación estándar al valor medio control). En el grupo control sólo 8 casos (15%) mostraron valores por encima de ese nivel, mientras que 34 pacientes (40%) presentaron valores mayores del que hemos estimado límite superior de la normalidad.

Por otro lado, los valores medios de ECP fueron mayores en los pacientes fumadores activos, en los que presentaban antecedentes familiares de atopia, en el sexo masculino, en los que presentaron metacolininas positivas, e IgE totales altas ($>150\text{U/l}$), aunque sin diferencias significativas (tabla 14).

IV.1.5.3. En relación a la puntuación de AAS (fig 5), encontramos que a mayor gravedad clínica los niveles medios de ECP séricos

eran mayores, a excepción del grupo más sintomático (AS5), en el cual fueron menores, y de los grados intermedios en que los valores eran muy similares (AS 2 y 3).

IV.1.5.4. Con respecto a la relación de los niveles de ECP y la gravedad clínico funcional del asma según el Consenso Internacional, realizamos previamente una evaluación global de todos los grupos (Kruskal-Wallis), siendo estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Los niveles medios de ECP en los tres grados de gravedad presentaron niveles significativamente mayores que en el grupo control (tabla 15). También encontramos diferencias significativas entre los niveles de asmáticos leves y moderados. Los valores en asmáticos graves diferían de forma llamativa, según hubieran recibido o no tratamiento con corticoides inhalados en las semanas previas a la determinación (medias en los tratados $12,95 \pm 8,39 \mu\text{g/l}$ y en los no tratados $25,05 \pm 20,55 \mu\text{g/l}$).

IV.1.5.5. Cuando establecimos la relación según la sensibilidad alérgica (tabla 15), comprobamos diferencias significativas, al evaluar de forma global todos los grupos (Kruskal Wallis $p < 0.001$), y posteriormente encontramos diferencias entre cada uno de los grupos (asmáticos con sensibilidad a polen, ácaros, mixtos o intrínsecos) y el grupo control, aunque con niveles medios superiores en los asmáticos con sensibilidad a ácaros.

IV.1.5.6. No hallamos correlación lineal significativa entre los niveles de ECP y los parámetros funcionales FEV₁, (en valores

absolutos y porcentajes respecto al teórico) y FEV1/FVC%. Tampoco encontramos correlación con los valores de PD20, con el índice de la pendiente de la curva dosis-respuesta, ni con los niveles totales de IgE (Tabla 16).

IV.1.5.7. Por último, sí obtuvimos correlación lineal significativa (fig 6) entre los niveles de ECP y la cifra total de eosinófilos (coef. Pearson=0.32, $p < 0.003$).

IV.2.DATOS EVOLUTIVOS CLINICOS, FUNCIONALES Y ANALITICOS EN CADA GRUPO SEGUN TRATAMIENTO.

IV.2.1.EVOLUCION DE LOS PARAMETROS FUNCIONALES.

Los parámetros funcionales (basalmente no muy afectados, excepto en los asmáticos graves), mejoraron en todos los grupos en que se inició tratamiento (tabla 17). No obstante, cabe hacer algunas puntualizaciones:-en los grupos A (asmáticos tratados con DPB inhalada) y C (asmáticos y riniticos tratados con DPB inhalada y budesonida tópica), la mejoría fue mayor cuando se evaluó tras los primeros 21 días de tratamiento, no modificándose prácticamente (o incluso tendiendo al empeoramiento en algún caso) en el mes siguiente; -en el grupo D (tratados con corticoides orales, por presentar sus componentes mayor severidad clínica), como era de esperar la modificación de los parámetros funcionales tras tratamiento fue más apreciable, presentando los pacientes tras el mismo, medias de FEV1/FVC, PEF y MMEF en valores similares al resto de los grupos.

IV.2.2.EVOLUCION CLINICA.

La evolución clínica (estimada por la media de los índices establecidos previamente- tabla 17), fue de mejoría sintomática en todos los casos del grupo D, y con medias muy cercanas a 1 ("mejoría") en el resto de los grupos, en el examen efectuado a los 21 ó 30 días. A los 60 días del comienzo del tratamiento, mostraron (en relación al estado clínico que presentaban a los 21 días), situación similar los pertenecientes al grupo A (medias cercanas a 2), mientras que en el C la evolución fue hacia mayor

mejoría clínica (medias cercanas a 1).

IV.2.3.EVOLUCION DE LOS NIVELES DE ECP Y CIFRA DE EOSINOFILOS.

En todos los grupos establecidos según el tratamiento, los niveles medios de ECP mostraron descensos estadísticos significativos desde los valores basales, a los que presentaron 21 ó 30 días después. A los 60 días de tratamiento, aunque los valores eran menores que a las 3 semanas, no presentaron diferencias significativas respecto a estos últimos (tabla 18).

Es destacable el mayor descenso medio para el grupo de tratados con corticoides orales (grupo D), y para el grupo con mayores niveles medios basales (grupo C).

Es apreciable, asimismo, que los niveles tras tratamiento fueron incluso inferiores a los del grupo control.

Al analizar más exhaustivamente los valores de ECP de los 60 pacientes incluidos en protocolo de tratamiento, obtuvimos los siguientes datos:

-En el total de los pacientes, encontramos valores de ECP basales por encima de los $15\mu\text{g}/\text{l}$ (límite estimado de normalidad) en 37 casos. Separando los que presentaron sintomatología exclusiva rinitica y los asmáticos, vimos que 26 asmáticos (67% del total) tuvieron niveles por encima de la normalidad, mientras que en los riniticos el incremento se objetivó en 11 (52% del total).

-En todos los casos con niveles basales mayores de $15\mu\text{g}/\text{dl}$ hubo descenso tras el tratamiento con corticoides, siendo más acentuado cuanto más elevado era el nivel basal. A los 21 días de tratamiento sólo quedaban 5 pacientes con valores (aunque descendidos respecto a los basales) aún por encima de los $15\mu\text{g}/\text{l}$.

Estos niveles descendieron en todos los casos tras 60 días de tratamiento.

-Se observaron escasos ascensos "paradójicos" de la ECP durante el tratamiento (en todos los grupos un total de 7; 5 a los 21 días y 2 a los 60). Estos incrementos se apreciaron en pacientes con niveles previos basales bajos, no aumentando, en ningún caso, por encima de los $15\mu\text{g/l}$, ni a los 21, ni a los 60 días.

Por otro lado, el número medio de eosinófilos en sangre de cada grupo (tabla 19), en la determinación basal se mantuvo en nivel inferior al que podemos considerar como rango de eosinofilia ($>400/\mu\text{l}$), a excepción del grupo D de asmáticos más graves, aunque en este grupo existía gran dispersión de los valores.

Tras el tratamiento estos niveles descendieron en todos los grupos, aunque en ninguno de ellos apreciamos diferencias significativas respecto a los basales.

Al establecer la relación entre el número de eosinófilos y los niveles de ECP séricos, se comprobó correlación lineal significativa para los valores basales (coeficiente de Pearson=0,34, $p<0.01$)(Fig 7), mientras que tras el tratamiento (a los 21-30 días), no se encontró esta relación (coeficiente de Pearson=0,17, $p=\text{NS}$) (Fig 8).

En la tabla 20 se aprecian los resultados de la relación establecida a través de tablas 2x2 para valores de ECP "positivos" o "negativos" (≥ 15 ó $< 15\mu\text{g/l}$, respectivamente) y el grupo de pacientes o control, siendo destacables los altos valores de Ods Ratio (OR), tanto para el grupo global de

pacientes, como para los distintos subgrupos establecidos (condición "ECP positiva" y "pacientes"), con p en todos los casos significativas.

IV.3. PREDICCIÓN DE REAGUDIZACIÓN CLÍNICA.

Teniendo en cuenta los términos en que se definió la elevación de ECP como predicción de empeoramiento, pudimos objetivar elevaciones que precedieron reagudización clínica en 6 casos (10% del total de los que se reagudizaron durante el seguimiento).

IV.4. ESTUDIO SENSIBILIDAD-ESPECIFICIDAD-VALORES PREDICTIVOS DE LA PRUEBA.

Este estudio, realizado en la primera revisión-determinación basal, mostró valores de sensibilidad (tabla 21) apreciablemente mayores cuando situamos el límite superior de normalidad en los $15\mu\text{g}/\text{l}$ en relación a los $20\mu\text{g}/\text{l}$ (75% y 55% respectivamente). Los valores de especificidad eran, obviamente, mayores para la segunda opción, aunque diferían en menor medida. Esto mismo sucedía para el VPP, mientras que el VPN era notablemente superior para el primer límite de normalidad. Por último, la eficacia global era similar, pero algo superior para la primera opción (82,19% frente a 80,82%).

IV.5. NIVELES DE ECP SEGUN TEMPERATURA (-20°C ó -70°C) Y TIEMPO DE CONGELACION (-20°C).

Para estimar si los niveles de ECP diferían según la temperatura de conservación, se estudiaron un total de 28 parejas de alícuotas de sueros (cada pareja extraída del mismo paciente y sesión), seleccionados de forma aleatoria del total.

Los niveles medios de ECP fueron de $12 \pm 24,4 \mu\text{g/l}$ para los congelados a -20°C y $12,61 \pm 27,96 \mu\text{g/l}$ para los congelados a -70°C , no existiendo, pues, diferencias significativas entre ambos. El tiempo medio de congelación fue de 15 ± 10 días.

Como este tiempo medio de congelación estimamos que era corto para establecer conclusiones, realizamos un segundo control de calidad y determinamos los valores (del mismo paciente y extracción) en distintos tiempos tras congelación a -20°C , para un total de 41 pacientes (fig 9). Los niveles medios de ECP en cada uno de los periodos de congelación evaluados (<15 , 15-30, 30-60, 60-180, 180-235 días) eran similares, no apreciándose, por tanto, diferencias significativas, ni tampoco entre los niveles determinados más precozmente (<15 días) y más tardíamente (período 180-235 días).

TABLAS Y FIGURAS DE RESULTADOS

TABLA 9
Parámetros funcionales, prueba de provocación con metacolina en los pacientes

	Nº	EDAD	FEV1%	PEF	MMEF	METAC*	PD20**
RINITICOS	17	32 ± 7	86 ± 7	113 ± 21	125 ± 28	(+)13%	8,44 ± 5,14
ASMA(GLOBAL)	69	29 ± 13	76 ± 13	88 ± 25	87 ± 35	(+)65%	75,29 ± 73,59
A.LEVE	44	26 ± 10	81 ± 9	95 ± 18	99 ± 30	(+)60%	87,92 ± 79,71
A.MODERADA	14	25 ± 11	74 ± 18	93 ± 22	91 ± 29	(+)80%	42,47 ± 45,73
A.GRAVE	11	46 ± 15	63 ± 12	54 ± 36	54 ± 36	-	-

FEV1:Flujo espiratorio forzado en el primer segundo. PEF:Pico flujo.MMEF:Flujo espiratorio(25-75%).

*Test de Provocación con metacolina (porcentaje de positividades).

**PD20 expresadas en UI acumuladas.

Datos expresados en medias ± DS

TABLA 10
Celularidad sanguínea de los pacientes

	n°	leucocitos	polimorfonucleares	eosinófilos
RINITICOS	17	6025 ± 2032	3692 ± 915	240 ± 227
ASMA(GLOBAL)	69	6856 ± 2565	4013 ± 2531	276 ± 285
A.LEVE	44	6384 ± 1480	3539 ± 1375	187 ± 97
A.MODERADA	14	6847 ± 1628	3725 ± 1447	449 ± 286
A.GRAVE	11	7977 ± 1921	5070 ± 1421	429 ± 566

Datos expresados en medias ± DS.

TABLA 11
Niveles de IgE, resultado de los tests cutáneos

	asmáticos	riniticos
IgE total*	289,18±261,16	384,82±370,18
tests cutáneos**:	81,16%	100%
Histamina#	global:40±22	global:45±17
DP#	+:29%(50±70) global:18±43	+:35%(61±16) global:24±29
PI#	+:7,29%(28±14) global:7±7	+:5,88%(35) global:7±8
PII#	+:26,08%(25±13) global:10±11	23,52%(32±14) global:11±14
PIII#	+:50,72%(49±31) global:28±31	+:76,47%(93±82) global:77±82
PIV#	+:49,27%(43±35) global:24±29	+:76,47%(43±35) global:36±35
PV#	+:27,53%(30±17) global:12±15	+:41,17%(30±23) global:16±20
OLIVO#	+:51,07%(45±32) global:27±32	+:41,17%(54±27) global:26±30

*expresado en IU/ml.

**porcentaje de tests cutáneos positivos respecto al total.

#porcentaje de tests cutáneos positivos. Entre paréntesis tamaño medio del habón(en mm²) en los que presentaron tests cutáneos positivos. Datos expresados en medias±DS.

global:tamaño medio del habón en todo el grupo de pacientes (tests positivos y negativos).

DP: Dermatophagoides Pteronissimus. PI,II,III,IV,V:Pólene I-V.

TABLA 12
Situación atópica de cada grupo de pacientes

Grupo	N°	Atópicos*	Polínicos	Acaros	Mixtos	Intrínsecos	??*
RINITICOS	17	100%(17)	13	1	3		
ASMA(GLOBAL)	69	81%(57)	41	8	8	8	4
A.LEVE	44	93%(41)	32	3	6	1	2
A.MODERADA	14	86%(12)	6	6	1	1	1
A.GRAVE	11	36%(4)	3	-	1	6	1

A: asma.

*: Porcentaje y número total, entre paréntesis.

??*: Pacientes no clasificados en los otros grupos, por no demostrarse sensibilidad alérgica y no ser claramente intrínsecos.

TABLA 13
Niveles de ECP en población normal(control) y en pacientes evaluados (asmáticos y riníticos)

	Nº	ECP*	p**
CONTROL	53	9,34±5,76(2-24,2)	
PACIENTES(TOTAL)	86	17,59±16,85(2,59-107)	p<0.001
ASMATICOS	69	18,29±18(2,59-107)	p<0.001
RINITICOS	17	14,76±10,94(3,8-46,8)	p<0.03

*Niveles de ECP(valores medios±DS; entre paréntesis rango de valores).

**Test U Mann-Whitney (entre los valores medios de ECP del grupo control y los valores de las otras poblaciones evaluadas).

TABLA 14

Niveles de ECP, según las características de la población

	ECP(μg/l)	ECP(μg/l)
Sexo	v=19,73\pm20,36*	h=15,82\pm13,23*
Fumador	sí=24,13\pm27,95*	no=16,22\pm13,32*
A.Familiares	sí=20,15\pm21,17*	no=15,37\pm11,70*
Metacolina	(+)=18,61\pm21,56*	(-)=16,18\pm10,50*
IgE total**	alta=20,79\pm22,57*	baja=18,76\pm15,61*

*p=NS

**IgEtotal "alta">150UI/l, "baja"<100 UI/L.

TABLA 15
Niveles de ECP según gravedad clínica y sensibilización alérgica.

	ECP($\mu\text{g/l}$)*	p**
Control	9,34\pm5,76	
Gravedad clínica		
A. Leve	13,8\pm10,51	<0.03
A. Moderada	31,44\pm29,33	<0.001
A. Grave	19,55\pm16,71	<0.03
Sensibilidad alérgica		
S. Pólenes	16,74\pm19,75	<0.05
S. Acaros	24,87\pm8,53	<0.001
S. Mixta	13,6\pm6,02	<0.05
Intrínsecos	22,25\pm18,49	<0.03

*Niveles de ECP (media \pm DS).

**Test U Mann Whitney (diferencias estadísticas respecto a grupo control).

Diferencias leves-moderados (p<0.01).

TABLA 16

Correlación de los niveles de ECP con parámetros funcionales, prueba de provocación y niveles de IgE

Correlación	ECP	
FEV1T*	r=0,12	p=NS
FEV1%**	r=0,09	p=NS
FEV1/FVC%	r=0,10	p=NS
PD20	r=-0,02	p=NS
INDICE+	r=0,04	p=NS
IGE Total	r=0,18	p=NS

+:Índice de la pendiente dosis-respuesta.

*FEV1T: FEV1 total (en cc).

**FEV1%: % respecto al teórico.

TABLA 17

Función pulmonar y evolución clínica de los distintos grupos establecidos según el tratamiento.

Grupos según tto	FEV1/FVC%*	PEF*	MMEF*	CLINICA**
A -Basal	73,38±11,30	88,92±20,34	84,83±29,92	
-21 días	76,27±10,55	91,20±25,43	92,36±38,63	1,19±0,40
-60 días	75,10±7,34	90,90±20,84	88,78±40,2	2,09±0,70
C -Basal	76,94±8,78	93,56±14,85	89,071±25,56	
-21 días	79,50±8,71	100,69±17	101,61±29,19	1,37±0,72
-60 días	78,57±11,79	100,43±23,33	112,60±40,36	1,28±0,48
D -Basal	69,63±11,48	65,87±35,58	71±40,99	
-30 días	78,86±8,11	82,71±23,24	92,80±44,17	1

PEF: Pico de flujo. MMEF: Flujo espiratorio al 25-75%.

Valores expresados en % respecto a los teóricos, según edad, sexo y talla (CECA).

**Evolución clínica estimada por la media de los índices.

(1-mejoría, 2-igualdad, 3-empeoramiento).

A: Asmáticos tratados con BDP(dipropionato de beclometasona) inhalada.

C: Asmáticos y riniticos tratados con BDP inhalada y Budesonida tópica.

D: Asmáticos graves tratados con BDP inhalada+Deflazacor oral.

TABLA 18
Evolución de los niveles de ECP en los distintos grupos
establecidos según el tratamiento.

	Basal	21 ó 30 días	60 días		d.+
Grupos con tratamiento:					
A)Asmáticos(beclometasona)	18,69±12,65	7,82±5,40*	5,68±5,65**	*p<0.01	10,87
B)Riníticos(budesonida)	16,47±15,28	6,41±4,68*	5,15±3,08**	*p<0.01	10,06
C)Asmáticos+Riníticos(b+b)	21,82±27,93	7,90±6,25*	7,08±3,91**	*p<0.04	13,92
D)Asmáticos(deflazacort)	19,38±17,83	3,14±1,38*		*p<0.01	16,24

*Diferencias significativas entre los niveles basales y a los 21(grupos A,B,C) ó 30 días(grupo D).

**Diferencias No significativas entre los valores a los 21-30 y 60 días.

(Test de Wilcoxon)

d.+ : diferencias entre los niveles medios basales y a los 21 ó 30 días.

Valores expresados en medias±DS.

TABLA 19
Niveles de eosinófilos y evolución de los mismos tras
tratamiento.

	Basal	21-30 Días	60 Días
Grupos con tratamiento:			
A) Asmáticos (beclometasona)	287 ± 255	217 ± 145*	200 ± 123**
B) Riníticos (budesonida)	286 ± 210	281 ± 202*	218 ± 130**
C) Asmáticos y Riníticos (b+b)	357 ± 219	297 ± 167*	266 ± 124**
D) Asmáticos (deflazacort)	480 ± 606	156 ± 87*	

*Diferencias No significativas entre los valores basales y a los 21-30 días.

**Diferencias No significativas entre los niveles a los 21-30 y 60 días.

Test estadístico utilizado: No paramétrico de Wilcoxon.

Valores expresados en medias ± DS.

TABLA 20

	OR	p*
Pacientes (global)	3,68(1,46-10,08)	<0.01
AAG	9,00(3,04-27,75)	<0.01
AANT	16,88(4,15-73,68)	<0.01
A grupo A	12,38(2,88-56,32)	<0.01
A grupo C	5,63(1,36-22,91)	<0.01
A grupo D	7,03(1,17-42,26)	<0.01
R grupo B	6,19(1,71-22,54)	<0.01

OR: Ods Ratio.

***: Test de Yates.**

AAG: Asmáticos agudizados (global).

AANT: Asmáticos agudizados no tratados previamente.

A grupo A: Asmáticos tratados con beclometasona inhalada.

A grupo C: asmáticos+ riníticos, tratados con beclometasona inhalada y budesonida tópica nasal.

A grupo D: asmáticos graves tratados con beclometasona inhalada+deflazacor.

R grupo B: riníticos tratados con budesonida tópica nasal.

TABLA 21

Estudio de sensibilidad, especificidad, según los distintos niveles de ECP

Media + 1DS (15μg/l)	Media + 2DS (20μg/l)
VP = 15	VP = 11
FN = 5	FN = 9
VN = 45	VN = 48
FP = 8	FP = 5
S = 75%	S = 55%
E = 84,9%	E = 90,56%
VPP = 68%	VPP = 68,75%
VPN = 95%	VPN = 82,75%
EFICACIA = 82,19%	EFICACIA = 80,82%

S = SENSIBILIDAD = $VP / (VP + FN)$

E = ESPECIFICIDAD = $VN / (VN + FP)$

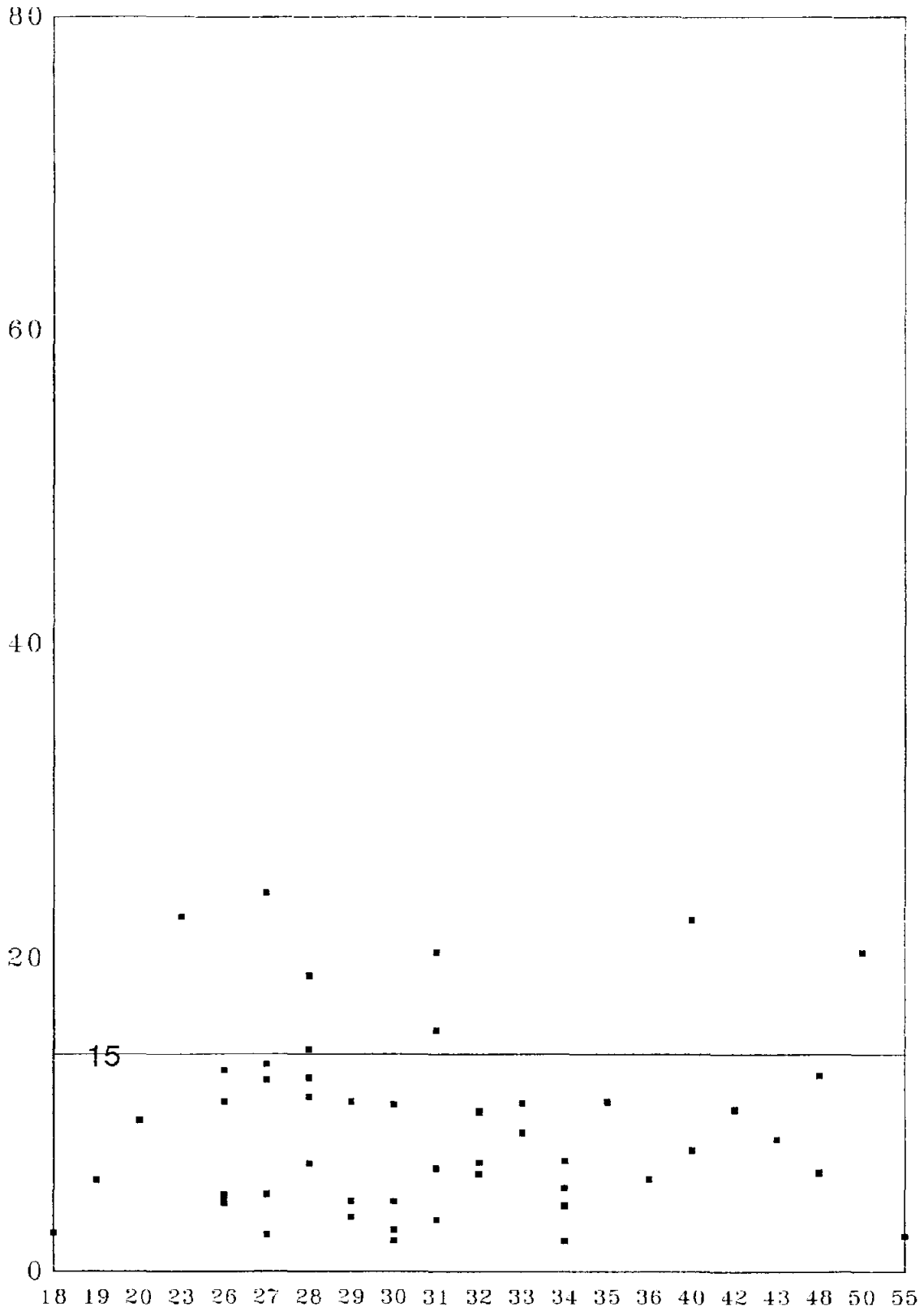
VPP = VALOR PREDICTIVO POSITIVO = $VP / (VP + FP)$

VPN = VALOR PREDICTIVO NEGATIVO = $VN / (VN + FN)$

EFICACIA = $(VP + VN) / (VP + VN + FP + FN)$

ECP $\mu\text{g/l}$

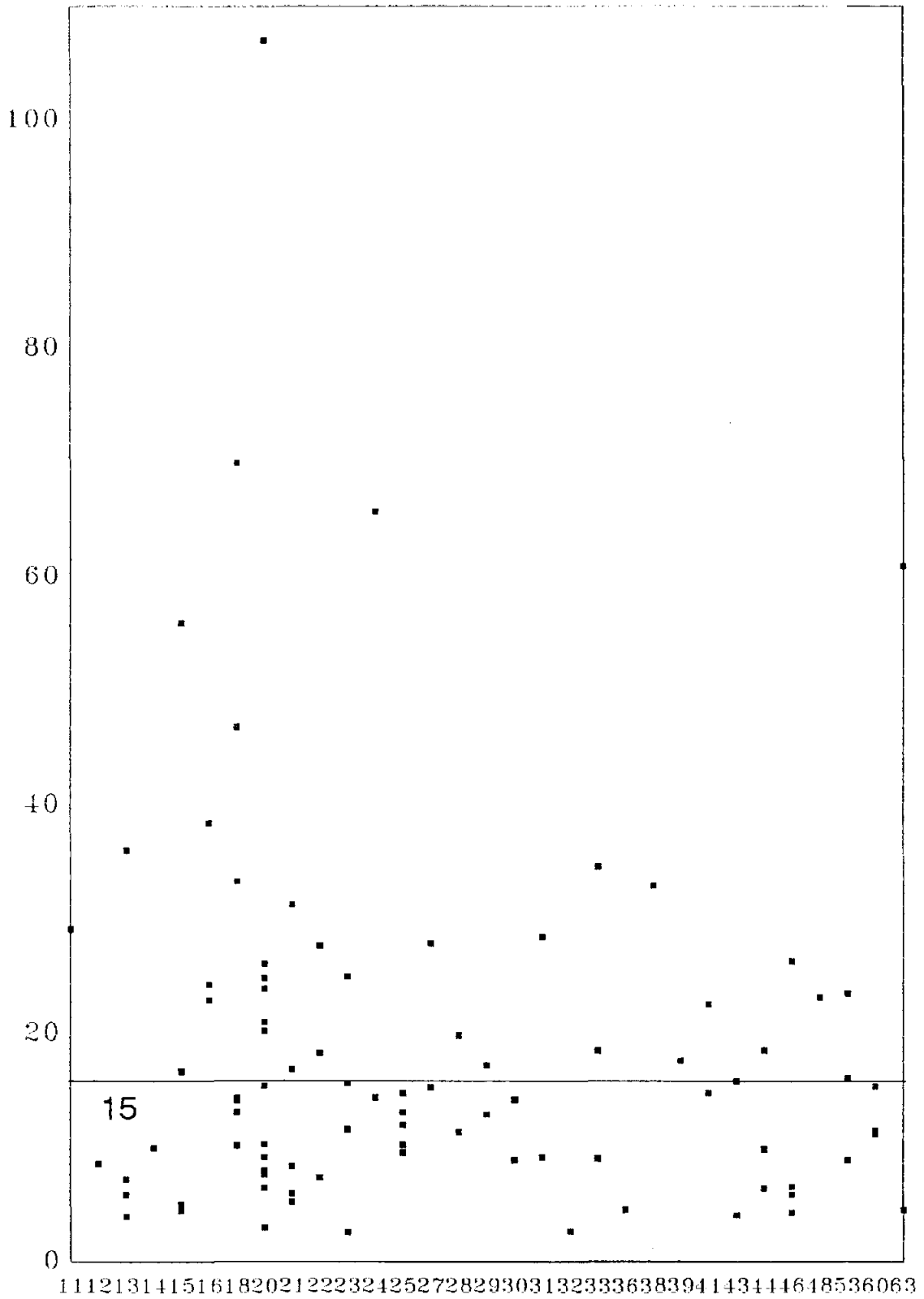
FIGURA 3



Niveles de ECP en la población control

ECP $\mu\text{g/l}$

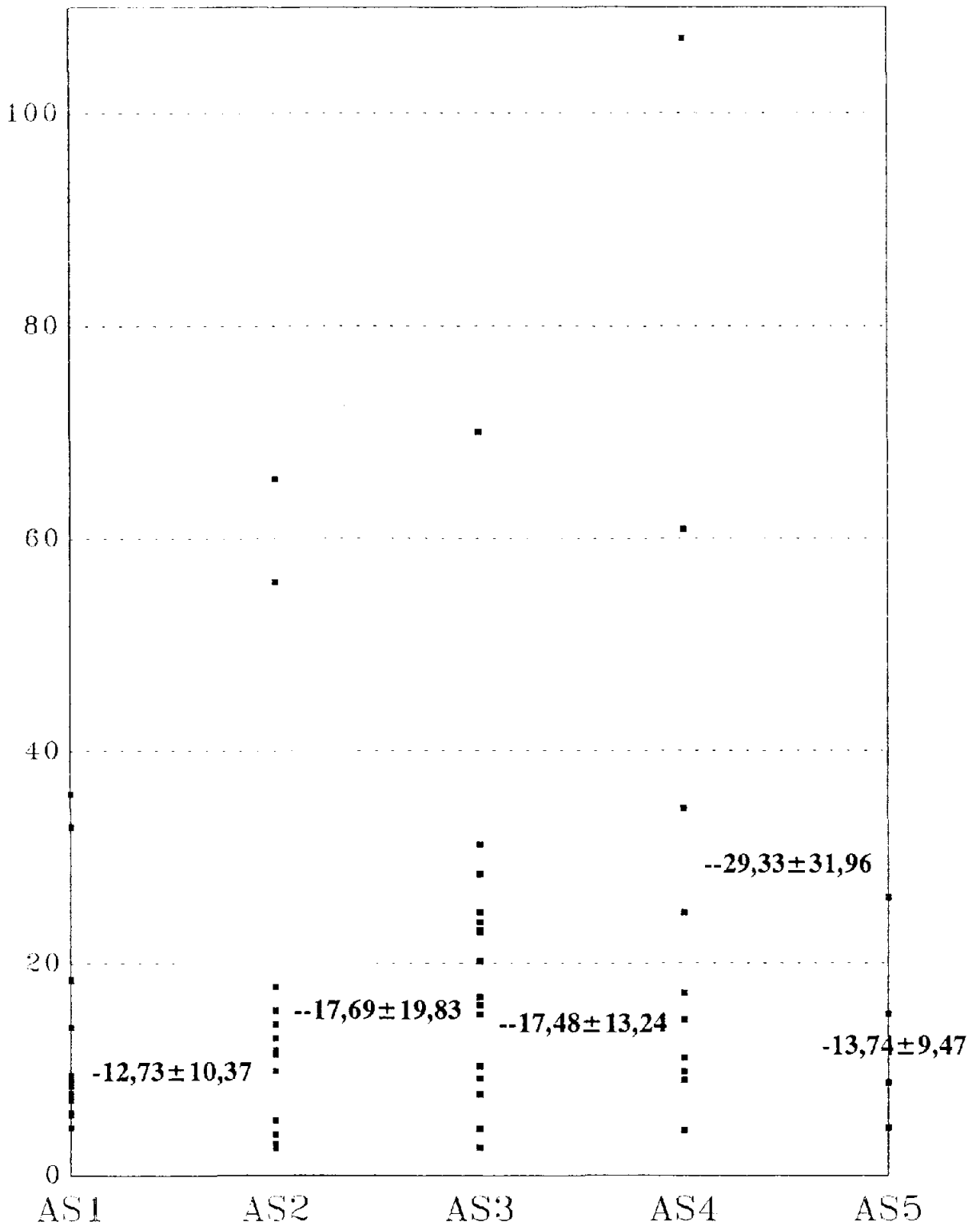
FIGURA 4



Niveles de ECP en los pacientes

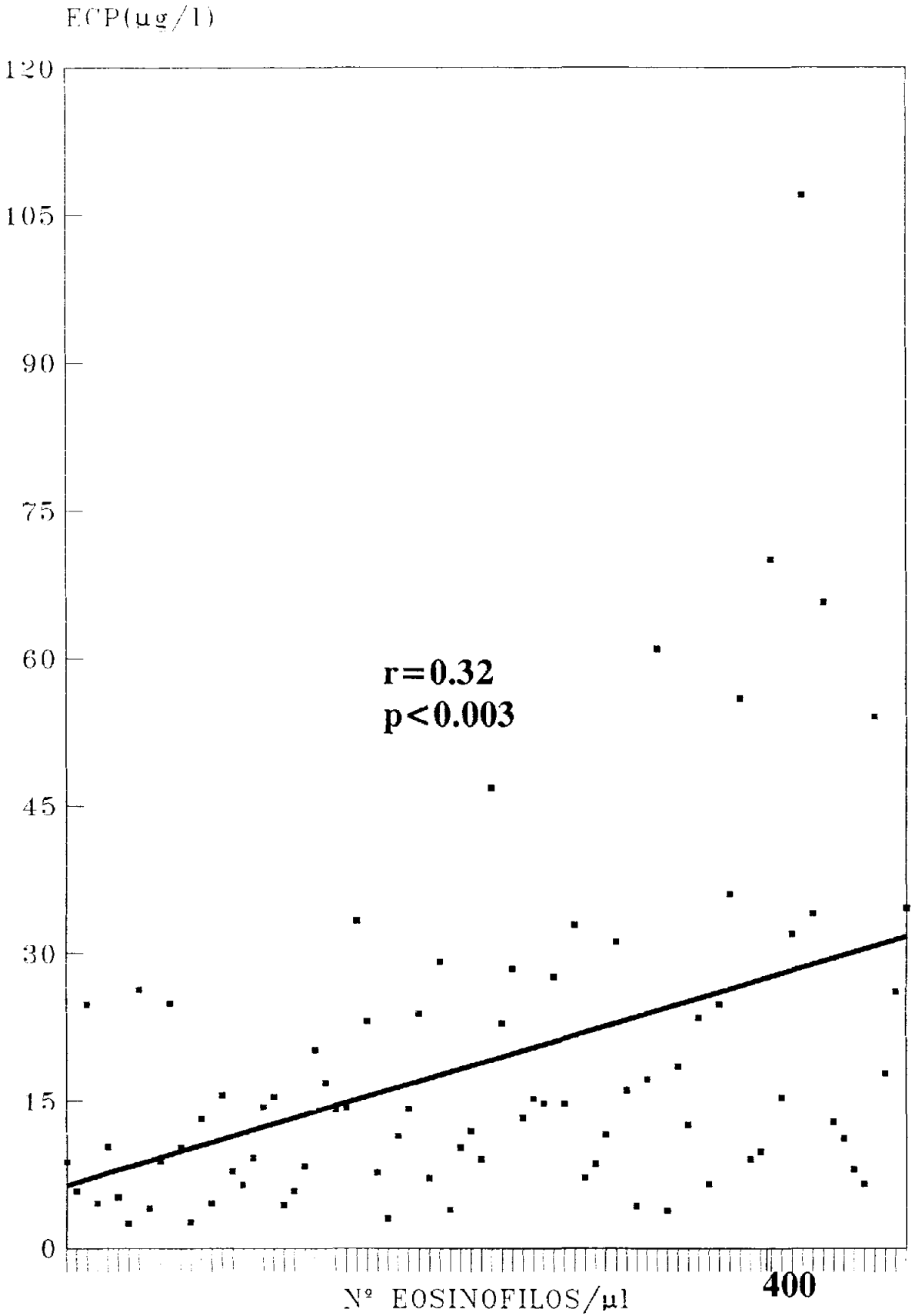
FIGURA 5

NIVELES ECP($\mu\text{gr}/\text{l}$)



Niveles medios de ECP, según score de síntomas

FIGURA 6



Relación ECP/nº eosinófilos en el global de pacientes

FIGURA 7

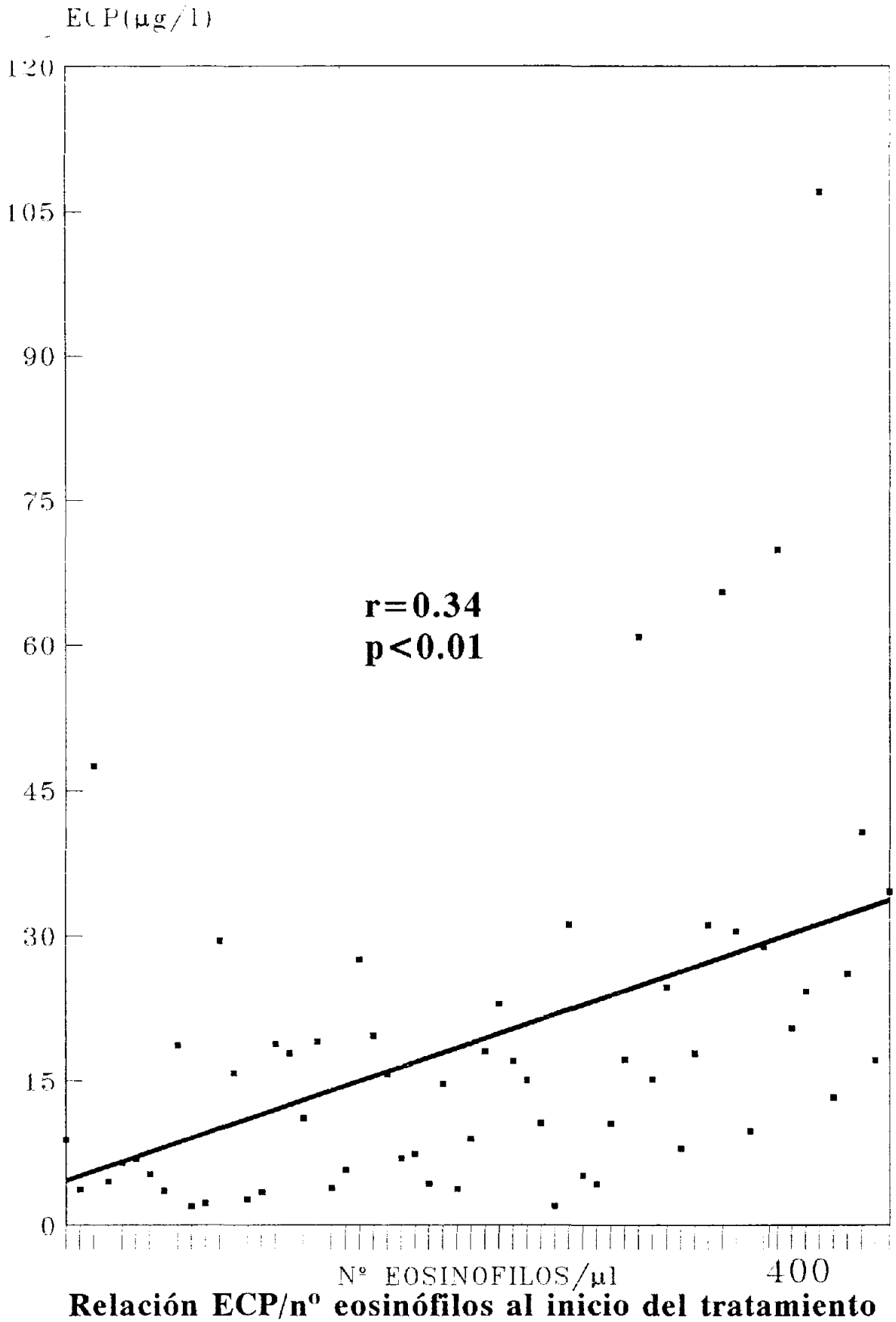
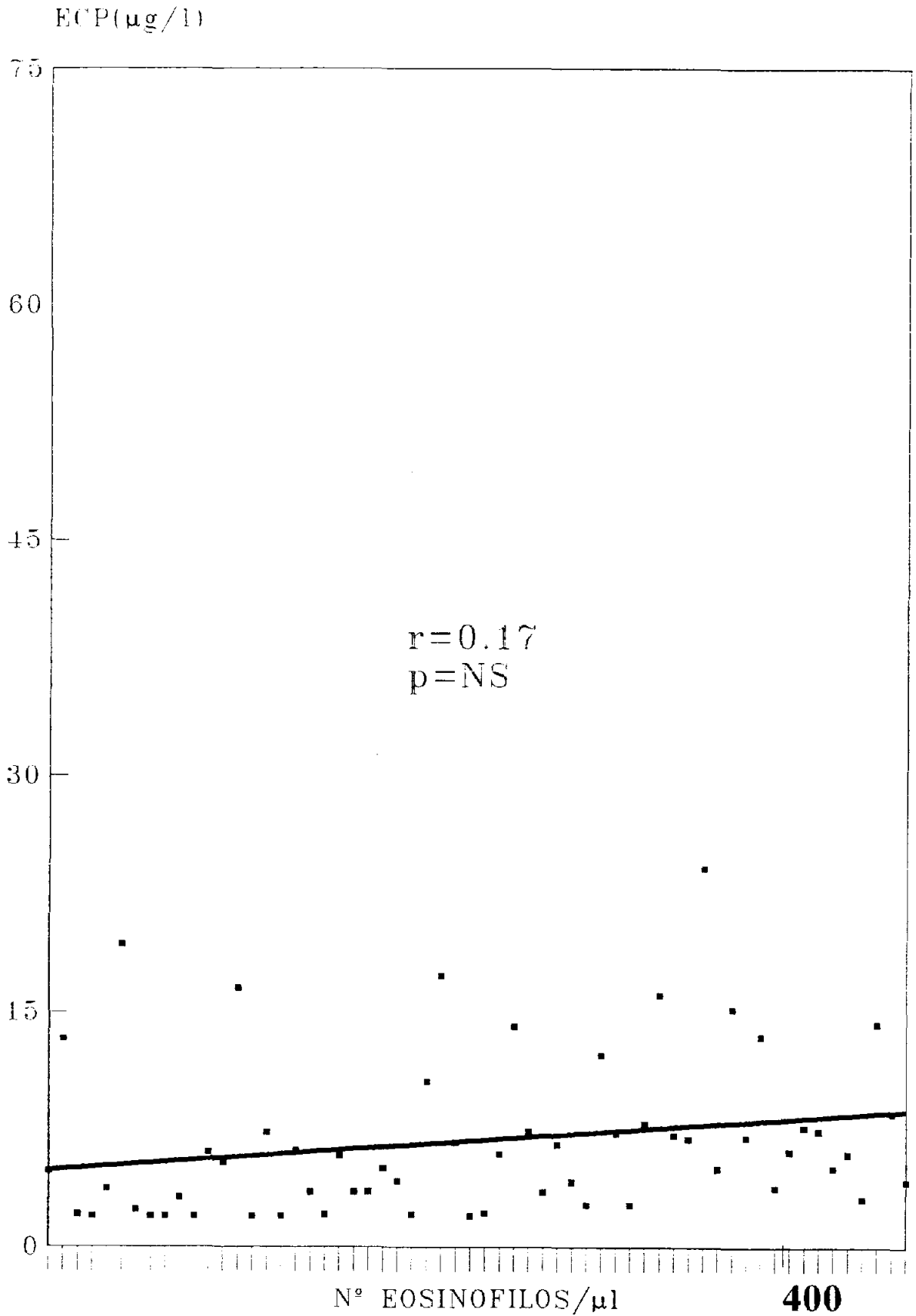


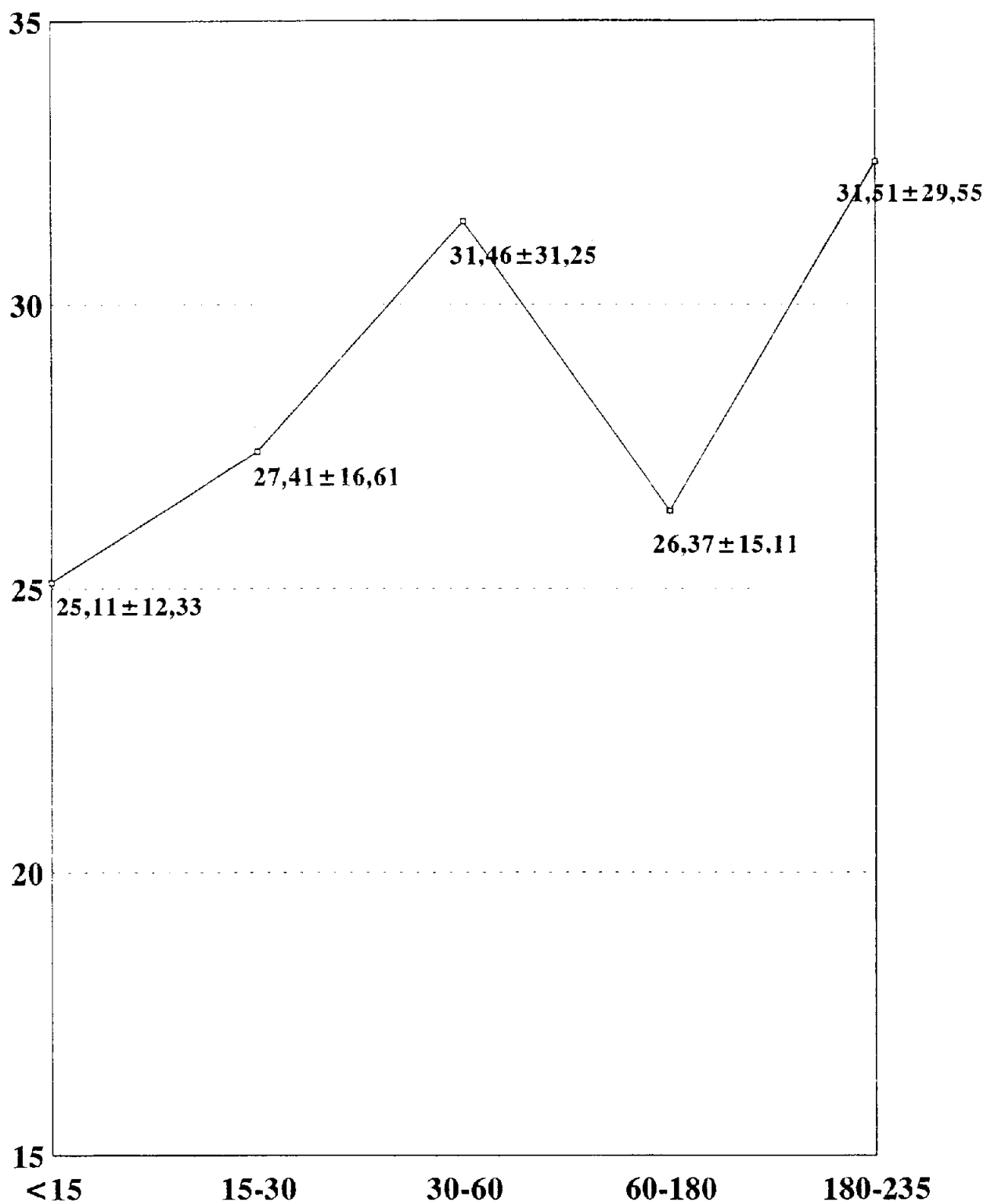
FIGURA 8



Relación ECP/nº eosinófilos tras el tratamiento.

FIGURA 9

Niveles medios de ECP($\mu\text{g/l}$)



Días

Evolución de los niveles de ECP, según los periodos de congelación

DISCUSSION

V.1.DISCUSION. PLANTEAMIENTO GENERAL.

En el presente trabajo se pretende una aproximación al fenómeno inflamatorio del asma. Ha quedado indicado cómo en los últimos tiempos se ha establecido la importancia de la inflamación en la patogénesis del asma bronquial, cómo intervienen múltiples células con funciones diversas, muchas de ellas motivo de investigación, cómo estas células liberan "mensajeros" para interrelacionarse entre sí y por último mediadores que actúan como efectores finales, responsables en gran parte de las alteraciones histopatológicas y, por tanto, de la sintomatología y semiología del paciente asmático.

El esquema patogenético es, pues, sumamente complejo, y por esto mismo debemos ser cautos al intentar extraer conclusiones del estudio de alguna de las células o mediadores implicados en esta inflamación.

En este sentido, como afirma Kay³⁰, la precaución debe imperar en las observaciones a nivel humano cuando se aborda este tema porque:

-La presencia de una determinada célula o mediador es un prerrequisito de su implicación, pero lo contrario no es cierto. Así, la presencia de una determinada célula en las vías aéreas no demuestra necesariamente su participación en la patogénesis, sino que simplemente podría indicar que la célula estuvo implicada en la regulación de la gravedad o en la extensión del efecto.

-Los estudios experimentales en las vías aéreas o en sangre (por la propia metodología de realización de los mismos), sólo

representan instantáneas estáticas de procesos que son enormemente dinámicos y cambiantes. Queda, por tanto, en duda si las células o mediadores que hemos estimado pudieran ser diferentes tiempo después o antes del momento elegido. Hasta que se determinen los índices y la cronología de las entradas y salidas (remoción) de células inflamatorias, no se podrá valorar la total importancia de una determinada célula en la reacción inflamatoria. Esto podría ser particularmente importante en lo que respecta a los granulocitos, ya que éstos pueden "descargar" mediadores y moléculas efectoras muy rápidamente tras su estimulación.

-El estado de activación de las células en una lesión, generalmente se desconoce. Esta activación puede ser distinta, dependiendo de las moléculas que las estimulen y la reiteración de tal estimulación. Así, la exposición a ciertas moléculas como interferón gamma, factor de necrosis tumoral, ect, que por sí mismas no inician una actividad completa, tras un estímulo subsiguiente sí producen un efecto mucho mayor. A pesar de que es difícil evaluar la importancia de este proceso en las reacciones inflamatorias in vivo, parece considerable el potencial de las células participantes para exteriorizar diferentes grados de reactividad y, consecuentemente, de efectos sobre las vías aéreas.

-La localización de las células o de los mediadores puede ser de vital importancia para la interpretación de su papel en los procesos fisiopatológicos. Así el BAL puede revelar una combinación celular diferente de la que aparece cuando sólo se lavan las vías aéreas. Este factor es aún más importante

cuando identificamos una determinada célula ó mediador en sangre y queremos atribuirle efectos que se ejercen a nivel local, osea, queremos demostrar que su nivel periférico puede ser reflejo de su valor y efecto en los tejidos, siendo lógicamente el propio tejido de las vías aéreas el lugar crítico de actuación de los mismos y, por tanto, teóricamente el único sitio válido para su estimación.

-Por definición, los mediadores son de acción relativamente corta. Esto significa, en general, que sus expectativas de vida en los tejidos o líquidos corporales son limitadas. La estabilidad de cada mediador en los líquidos biológicos y lavados varía significativamente. Así, la detección de mediadores en BAL y más aún en sangre, puede desfigurar de forma significativa la verdadera combinación de moléculas que, de manera dinámica, impregnan los tejidos in vivo.

-Las células inflamatorias pueden estar significativamente modificadas por el entorno de las vías aéreas. Células estructurales (como se ha indicado para las epiteliales), pueden tener un importante papel en la modulación de la acción, especialmente reduciendo los efectos lesivos de las células inflamatorias. Probablemente estos efectos son de importancia considerable en el comportamiento de las vías aéreas ante una respuesta inflamatoria.

Según todo lo anterior, puede parecer simplista establecer conclusiones que se puedan extrapolar, con el análisis de un único mediador (ECP), y de una sóla de las células implicadas en la inflamación (eosinófilo), que lo elabora.

Sin embargo, es necesario subrayar, (como quedó referido en la

introducción), que existen múltiples evidencias previas, basadas en estudios realizados tanto en biopsias bronquiales como en BAL, que establecen la importancia del eosinófilo y en concreto de la ECP, como causante de las alteraciones histológicas encontradas y su conexión con la gravedad clínica y funcional de los pacientes^{51,53,59,60,156-159}.

Asimismo, se ha apuntado en la literatura el incremento sérico de este mediador en el asma sintomático^{133,169}, en el asma polínico de forma estacional¹⁶⁶, o tras la realización de ejercicios en el asma inducida por el esfuerzo¹⁷², así como su descenso tras tratamiento antiinflamatorio inhalado o vía oral^{133,164,167,170,175}.

Así, esta buena conexión entre los niveles de ECP y la gravedad clínica del asma y su evolución tras tratamiento, podría permitirnos disponer de un marcador biológico de actividad de la enfermedad, que pueda ser utilizado para monitorizar la respuesta al tratamiento. Dispondríamos así de un eslabón de conexión entre un efector final que provoca directamente lesiones histológicas y los síntomas del paciente.

Por otro lado, en respuesta a las objeciones planteadas al principio, existen evidencias de que la ECP es realmente efectora de la destrucción epitelial y no sólo actúa de "espectador" o "modulador" de las lesiones. En los estudios de biopsias bronquiales efectuados, sobre todo por el grupo de Bousquet^{51,53}, se describe que en las áreas de la membrana basal epitelial en que se objetiva la ECP (mediante estudio inmunohistoquímico con anticuerpos monoclonales antiECP) liberada por los eosinófilos activados, es donde existe mayor destrucción del epitelio

subyacente, a diferencia de las áreas donde se objetivan eosinófilos pero con la ECP en situación intracelular (de eosinófilos no activados). Esto indica que lo verdaderamente importante no es simplemente la presencia del eosinófilo (que sí puede ser simple "espectador"), sino su activación^{67,174} y consecuente liberación de mediadores al medio extracelular, como efectores finales de daño epitelial.

En cuanto a la vida media de la ECP, es conocido que es corta, siendo el tiempo de eliminación de sangre ($t_{1/2}$) en torno a 65 minutos. Este "turnover" está acelerado en el asma aguda, oscilando tras la estimulación alérgica de 15 a 30 minutos¹⁰⁴. Según esto, podría parecer que es de poco valor una estimación puntual cada 15 ó 30 días para ver la evolución de los niveles. Sin embargo hay que reseñar que (a diferencia de lo que sucede en el laboratorio tras una exposición alérgica puntual, en que los niveles alcanzan en poco tiempo un nivel elevado y luego descienden), en la exposición alérgica "natural" es previsible que la actividad inflamatoria mantenida sea consecuencia de un "continuum" de exposiciones-activaciones celulares-liberación de mediadores. Así, podríamos tener un círculo vicioso, que mantendría estos niveles elevados de forma prolongada, hasta que mediante la terapia antiinflamatoria lo rompiésemos.

Dada la imposibilidad de una monitorización continua de los niveles de este u otros mediadores, es posible que esta "imagen estática" pueda tener valor para el control de la actividad inflamatoria y la respuesta al tratamiento.

Además, como ha quedado expresado también en la introducción, es destacable la importancia precisamente de la ECP, en relación con

los demás mediadores, como causante de las alteraciones histológicas y que, en el modelo indicado de "círculo vicioso" o "cascada de activación", es probable que mediante el estudio de una "parte" podamos tener una idea cuanto menos aproximada de lo que pueda suceder en el "todo" de la inflamación.

V.2.DISCUSION DEL METODO.

La elección de la determinación de ECP en suero en lugar de otros líquidos (BAL), lavados nasales, ect, donde los niveles pueden reflejar de forma más directa lo que sucede a nivel de la vía aérea ó mucosa nasal, se sustenta por un lado en la aceptable correlación que se ha encontrado entre los niveles en suero y BAL⁵⁹; por otro en los estudios previos en suero que indican su posible correlación con parámetros clínicos y respuesta al tratamiento^{133,164,167,169,170,175}; por último, siendo un trabajo en el que se seguía a un grupo amplio de pacientes en diversas situaciones de gravedad clínica y edad durante un tiempo prolongado, se pretendía que sirviera para su utilización práctica en la monitorización del paciente asmático. Resulta obvio que no son los estudios de muestras recogidas por Fibrobroncoscopia (por las molestias y propia morbilidad de la técnica), los más idóneos para este objetivo, aunque sean importantes en análisis experimentales.

En nuestro estudio existen dos partes bien definidas. Una primera en la que se determinan los niveles de ECP en un grupo de pacientes asmáticos y/o riniticos, (casos) y otro de población sana (control) sin antecedentes de atopia, estimándose las diferencias entre los valores medios de ambos grupos. Una segunda parte en la que se establecen varios subgrupos de pacientes, según la sintomatología que presentan, y por tanto, el tratamiento indicado. No creímos esencial el seguimiento de los niveles de ECP en la población control, puesto que los valores

basales eran bastante cercanos a los descritos en la literatura (como después comentaremos), y no se aprecian diferencias significativas en los mismos entre los distintos grupos, aún estimados en distintos momentos del año.

Por otro lado, los resultados quizás hubiesen sido más extrapolables y significativos si hubiéramos considerado un grupo de pacientes asmáticos reagudizados y no tratados (o sin tratamiento antiinflamatorio), en el que se estimara la evolución espontánea de los niveles de ECP. Sin embargo, no consideramos éticamente aceptable, a la luz de los conocimientos actuales, el seguimiento a largo plazo de un grupo de pacientes agudizados en el que no entraran los fármacos antiinflamatorios (y en concreto los corticoides) en su esquema terapéutico habitual. Por tanto, diseñamos el tratamiento y seguimiento de los pacientes, aportando las ventajas de un mayor control de su enfermedad, a través de más revisiones de lo habitual y un servicio telefónico disponible, y eliminando cualquier planteamiento negativo que se efectuara para obtener unos resultados quizás más "definitivos". Además consideramos esta investigación como inicial, para una posible aplicación práctica en el seguimiento clínico habitual, con lo que el mismo debía acercarse a lo realizable en el trabajo diario.

Este ensayo posee un tamaño de muestra aceptable y suficiente para que los resultados sean válidos, tras ser realizada una estimación inicial del tamaño de la muestra necesaria. Además los subgrupos establecidos son superiores en número a estudios similares existentes en la literatura consultada. Así, en el

trabajo de Juntunen-Backman y cols¹⁶⁴., se evalúan dos grupos de pacientes de 10 y 7 componentes, tratados con budesonida o cromoglicato sódico respectivamente. Zimmerman y cols¹³², en un primer estudio estiman la evolución de los niveles de ECP tras tratamiento con esteroides inhalados en un grupo de 17 asmáticos sintomáticos y 17 asintomáticos, constando su grupo control de 13 componentes; en otro posterior¹⁷⁰ estiman esta evolución en 14 asmáticos atópicos y 13 no atópicos. Por último los grupos investigados por Griffin y cols.¹⁶⁷ son todos ellos menores de 10 componentes y Venge y cols.¹⁷⁴ analizan una población de 13 asmáticos.

En el seguimiento de los pacientes tuvimos escasas pérdidas, que en todos los casos fueron al inicio del estudio, existiendo un cumplimiento notable por el resto de los pacientes, tanto de los periodos de seguimiento, como del tratamiento propuesto. Esto, posiblemente se debió, a una concienciación previa de los pacientes de la importancia del seguimiento de su enfermedad, siendo puesto especial énfasis en el cumplimiento y administración correcta del tratamiento, y por el hecho de que disponían en todo momento de un número telefónico al que podían llamar en cualquier momento de empeoramiento de los síntomas.

Excluimos del análisis a los pacientes con clínica de infección concomitante de las vías respiratorias, puesto que esta patología puede alterar por sí misma los niveles de ECP. De esta forma, no consideramos esencial para los resultados y conclusiones de nuestro trabajo (como ha sido descrito¹⁶⁹) la estimación de otros mediadores, como la mieloperoxidasa neutrofílica, para hacer la distinción de agudización de causa alérgica o infecciosa.

Las poblaciones globales estudiadas (control y pacientes) eran homogéneas en edad y sexo siendo, en todo caso, la distribución de los valores de ECP igualmente homogénea por edades. Obviamente, en los distintos subgrupos estimados según gravedad clínica y sensibilidad alérgica, las medias de edad diferían, sobre todo en los asmáticos intrínsecos y graves, con medias mayores (como eran de esperar) en estos casos.

La situación clínica fue estimada por dos métodos: el propuesto por Aas⁵² y el indicado en el último Consenso Internacional de diagnóstico y tratamiento del asma⁷. Esto fue así, en el primer caso porque es utilizado en múltiples trabajos para establecer correlaciones entre la situación clínica y los marcadores biológicos de inflamación. En el segundo caso, porque creíamos era el más adecuado como indicador de situación clínica en el momento de la revisión, independientemente de la situación previa durante todo el año, por lo que probablemente (como así fue), se relacionara mejor que el anterior con la actividad inflamatoria del sujeto en cada revisión.

El análisis de la evolución clínica del paciente se intentó que fuese lo más sencilla posible. Por este motivo se establecieron tan sólo tres niveles numéricos, según lo indicado por el paciente en el interrogatorio. Así, se puntuó con 1,2 ó 3 según la evolución sintomática fuese de mejoría, igualdad o empeoramiento de los síntomas, respectivamente.

El análisis de los niveles de ECP se realizó siguiendo las instrucciones indicadas por el laboratorio que suministraba los Kits de determinación (Farmacia). Se tuvo especial cuidado en

la técnica de extracción, conservación inicial de la sangre, centrifugación, y posterior separación del suero. Así se realizaron las determinaciones en cada uno de los pacientes a la misma hora, manteniendo la sangre a temperatura ambiental constante (aproximadamente 20°C), hasta su centrifugación. El espacio de tiempo entre la extracción y la centrifugación fue similar e inferior a los 60 minutos, realizándose la anterior maniobra siempre a las mismas revoluciones y tiempo. Intentamos así evitar las variaciones en los niveles de ECP descritas en la literatura por la elevada temperatura ambiental²⁷², excesivo tiempo antes de centrifugación²⁷³, insuficiente centrifugación²⁷³ y ritmo circadiano de eosinófilos y ECP²⁷¹.

La conservación de los sueros se realizó a -20°C. En este sentido existen discrepancias en los distintos estudios, en cuanto a las temperatura de conservación necesaria, con una mayoría que los realizan a -70°C^{165,167,174,175} y otros que los realizan a -20°C^{164,172}. Dada la importancia metodológica de este hecho y el importante sesgo que pudiera influir en los resultados finales, decidimos realizar un estudio paralelo en el que se consideraron las dos temperaturas de congelación, así como otro en el que se estimaron los niveles (a -20°C), en distintos plazos temporales. Como conclusión encontramos poca incidencia de la temperatura y del tiempo de determinación en los niveles de ECP y, por tanto, la buena estabilidad a -20°C. Este hecho abarata la técnica, ya que no es necesario para su conservación un congelador de gran potencia.

Los periodos de determinación de ECP una vez iniciado el

tratamiento nos parecen los adecuados, puesto que podrían ser aplicables para la monitorización práctica de los pacientes sin que éstos abandonen el seguimiento, y son similares, ó incluso inferiores, a los descritos por algunos autores para la evaluación de la actividad clínico-inflamatoria de la enfermedad tras tratamiento. En los estudios referidos, estos periodos de análisis oscilan desde las 2^{133,170}, 4^{172,174} ó 5¹⁶⁷ semanas hasta los 5 meses¹⁶⁴.

V.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

En nuestro estudio obtuvimos unos niveles medios séricos de ECP en la población control ($9,32\mu\text{g/l}$), similares a los referidos en series previas, que oscilan entre los $6\mu\text{g/l}$ ¹⁰⁴, y los $13\mu\text{g/l}$ ¹⁶⁶, y muy cercanos a los $9,8\mu\text{g/l}$ que obtienen Zimmerman y cols.¹³³ en su grupo control. Sin embargo, hay que señalar que en ese trabajo el grupo control es pequeño (13 componentes) y contiene 5 individuos atópicos.

Estimamos como límite superior de normalidad los $15\mu\text{g/dl}$ (valor medio+1DS), y no los $20\mu\text{g/dl}$ (valor medio +2DS), tras los resultados del estudio de sensibilidad-especificidad. Al tratarse de un estudio de casos-contróles, los resultados de sensibilidad, especificidad, ect.. que obtuvimos no tienen mayor significado que la simple comparación entre ambos límites, puesto que las muestras seleccionadas no están corregidas por la proporción real de enfermos-sanos de la población total. Así, los valores predictivos de la prueba han de estar necesariamente sesgados por el tamaño de las poblaciones elegidas.

Los niveles medios que encontramos en el grupo de pacientes asmáticos son inferiores o similares a los referidos en la mayoría de las series, y algo superiores a los indicados en otras. Así, esos niveles oscilan desde los $13\mu\text{g/l}$ descritos por Fergusson y cols¹⁶⁵ ó Juntunen-Backman y cols¹⁶⁴ (en la serie de Fergusson esos valores son para asmáticos sintomáticos, siendo de $12\mu\text{g/l}$ para los asintomáticos) y los $56,6\mu\text{g/l}$ de Venge y cols¹⁷⁴. Zimmerman y cols¹³³, por su parte, indican valores de

28,9 μ g/l en asmáticos sintomáticos y 18,5 μ g/l en asintomáticos y, en un trabajo posterior¹⁷⁰, describen niveles de 36,9 μ g/l en su grupo de asmáticos sintomáticos atópicos, y 10,8 μ g/l en los no atópicos. Mientras, Griffin y cols¹⁶⁷, refieren 28 μ g/l y 23 μ g/l respectivamente. Estas diferencias dependen, en la mayoría de los casos, de la estabilidad o gravedad clínico-funcional de la población estudiada, así como del grado de sensibilización alérgica y el momento del año en que se han determinado los niveles, no olvidando la posibilidad de distorsión que producen los problemas metodológicos descritos. Es además destacable un hecho: en las series donde los valores de ECP son menores es precisamente donde se subraya el escaso valor de esta determinación como monitorización de la actividad clínico-inflamatoria de la enfermedad.

En nuestro trabajo y en la primera determinación, el nivel medio relativamente bajo que encontramos en los pacientes, pudo ser debido al amplio grupo de asmáticos estables clínicamente (en los cuales, los niveles eran bajos) y por otro, a los reagudizados graves que realizaban tratamiento con corticoides inhalados previamente. En el caso de la determinación basal en los grupos que se agudizaron y entraron, por tanto, en protocolo de tratamiento, estos niveles algo inferiores quizás fuesen debidos a los siguientes motivos:-en algunos casos la reagudización no era muy acentuada para producir una elevación más notable de los niveles de ECP, como se demuestra por la escasa afectación funcional; -en el caso de los asmáticos graves se permitía el tratamiento previo con corticoides inhalados (con lo cual era previsible que los valores fuesen menores); -la determinación se

realizaba aproximadamente a las 24 horas del inicio de la reagudización (una vez el paciente se ponía en contacto telefónico con nosotros y era revisado), permitiéndose mientras tanto que el paciente utilizara B2 agonistas inhalados de corta duración, lo cual pudo descender en alguna medida los valores de ECP (efecto descrito en la literatura²⁷⁴, aunque de forma mucho menor que con el tratamiento antiinflamatorio); -por último la propia heterogeneidad de los pacientes en cuanto a la existencia de asmáticos atópicos, con distintas sensibilidades alérgicas, y no atópicos.

No obstante, es de destacar, en sintonía con la mayoría de autores mencionados, el hecho de que los valores sean significativamente más altos en todos los grupos de asmáticos en relación con la población normal.

En el grupo de riníticos sin sintomatología bronquial añadida, los valores de ECP medios son menores que en los que presentaban asma bronquial, aunque también con diferencias significativas respecto al grupo control. Esto último no ha de extrañar, considerando (como fue abordado en la introducción), que tanto los "inductores" iniciales, como los "mensajeros", células y mediadores implicados en la inflamación de la mucosa nasal no parecen diferir de los causantes de este proceso a nivel del árbol bronquial de los asmáticos. Así, se ha demostrado elevación tanto de los niveles de ECP, como de otros mediadores inflamatorios en fluidos de lavados y secreciones nasales de pacientes con polinosis^{215,254,262}, así como su descenso tras tratamiento con corticoides vía nasal^{259,260}. Los niveles séricos se han descrito significativamente elevados²⁶², o similares¹⁶⁵ a la

població sana.

Por otro lado, al evaluar la gravedad clínica de los pacientes asmáticos mediante los grados establecidos por Aas (que son utilizados en diversos estudios por correlacionarse con parámetros funcionales (FEV1)²⁷⁵), encontramos relación inadecuada con los niveles de ECP en suero, presentando niveles inferiores en el mayor grado de gravedad clínica y similitud en los grados intermedios. En un proceso cambiante en intensidad por definición, como es el asma bronquial, es de esperar que el nivel de ECP en un momento concreto no sea representativo del estado del enfermo durante todo un año.

Cuando aplicamos la clasificación clínico-funcional según los criterios del Consenso Internacional⁷, obtuvimos que los niveles de ECP eran significativamente mayores en los tres grados de gravedad con respecto al grupo control, aunque en los asmáticos graves los niveles eran inferiores que en los moderados. Esto pudo deberse (como en el caso de los valores del AS5) al hecho de que más de la mitad de los asmáticos más graves habían recibido tratamiento con corticoides inhalados en las semanas previas a la determinación de ECP. A favor de esta hipótesis está el hecho de que, cuando estimamos los niveles de forma separada según hubieran o no recibido tratamiento, obtuvimos cifras inferiores a las del grupo de asmáticos leves, en el caso de haberlo realizado.

Otra posible explicación es la apuntada por Bousquet y cols⁵¹, que estudian los niveles de ECP en BAL, y encuentra de forma "llamativa" valores menores de ECP en el grado mayor de severidad

que evalúan (AS4) en relación al grado 3, indicando que este hecho es debido al curso natural de los sucesos histológicos que tienen lugar en un proceso inflamatorio crónico como es el asma, donde en estadios tardíos disminuye la liberación de mediadores, dando paso al predominio de procesos de índole reparativo.

Además hay que tener presente que el asma no es sólo inflamación y que en los asmáticos más graves, precisamente por las lesiones histológicas que acontecen, es posible la existencia de sintomatología y alteración funcional, sin incremento de parámetros inflamatorios, al encontrarse las fibras nerviosas "más expuestas" a los estímulos exógenos.

Es de destacar, además, que encontramos diferencias significativas entre el grupo de asmáticos leves y moderados siendo, por tanto, los pacientes con inestabilidad clínica (y no tratados previamente) los que presentaron cifras mayores de ECP ($31,44\mu\text{g/l}$), similares a las que se describen en algunos de los trabajos referidos anteriormente.

Hay que reseñar de todas formas la alta variabilidad de los niveles de ECP (lo cual se aprecia por las DS), que indica las acentuadas diferencias interindividuales existentes. Esto, aunque en una primera valoración puede ser una dificultad para la aplicación práctica de estos niveles, como después veremos, nos servirá para estimar precisamente en qué grupo de pacientes su utilidad puede ser mayor.

Al estimar los niveles de ECP según la sensibilidad alérgica, encontramos valores medios más elevados en los que mostraron sensibilidad a los ácaros, lo cual era de esperar dada la época del año en que fueron realizadas la mayoría de primeras

determinaciones (otoño). En el resto de los grupos los niveles fueron menores, aunque con diferencias significativas con respecto al grupo control. Es destacable que nuestro grupo de asmáticos intrínsecos mostró niveles medios de ECP relativamente altos, por lo que no encontramos las diferencias descritas en la literatura entre asmáticos atópicos y no atópicos^{167,170}. Hay que indicar, sin embargo que esta media superior fue debido a los elevados valores de 2 miembros del grupo (compuesto por 8 individuos). El resto de los componentes del mismo presentaron valores menos elevados, e incluso similares a los del grupo control.

No encontramos diferencias significativas en los valores de ECP cuando fueron consideradas las variables sexo, tabaquismo, antecedentes familiares de atopia, positividad o no de la prueba de metacolina y valores de IgE elevados ó no, aunque sí encontramos niveles algo mayores en varones, fumadores, existencia de antecedentes familiares, IgE elevada y metacolina positiva. En este sentido, nuestros hallazgos son similares a los descritos por Fergusson y cols^{157,165} que tampoco encuentran relación entre los niveles de ECP y el grado de hiperreactividad bronquial estimada por la prueba de provocación con histamina o metacolina.

Comprobamos, además, la existencia de una correlación significativa entre los niveles de ECP y la cifra de eosinófilos en sangre periférica, cuando se estimaron basalmente. Esta correlación es similar o algo inferior a lo referido en la literatura^{142,165-167}.

De lo anterior pueden derivarse interrogantes como: ¿por qué no se utilizan simplemente estos niveles de eosinófilos para la evaluación clínica y respuesta ulterior al tratamiento?, o expresado de otra forma ¿qué aporta el estudio de los mediadores liberados por los eosinófilos a la determinación del valor absoluto de eosinófilos en sangre?. En respuesta a esta pregunta cabe plantear que una cosa es el número de eosinófilos y otra su grado de activación.

A favor de esta suposición están los hallazgos obtenidos por Bousquet y cols.^{51,53}, ya referidos, que describen que en las áreas de la membrana basal epitelial en que se objetiva la ECP es donde existe mayor destrucción del epitelio subyacente.

Esto indica que lo verdaderamente importante no es simplemente la presencia del eosinófilo, sino su activación y la consiguiente liberación de mediadores al medio extracelular.

Por otro lado, en otros estudios¹⁶⁷, se ha sugerido que la determinación de los niveles de ECP probablemente aporte escasa información adicional al recuento de eosinófilos en sangre, en los pacientes con asma que presentan pronunciada eosinofilia, mientras que en los pacientes con eosinófilos normales o moderadamente elevados aportaría información valiosa, al poder existir cifras periféricas de eosinófilos relativamente bajas y sin embargo importante activación de los mismos (por tanto niveles de ECP elevados). Este hecho es explicado porque posiblemente en los casos con cifras normales o moderadas de eosinófilos, la reducción sea compensada con una mayor actividad de los mismos, existiendo la suficiente concentración de células para conservar la "cascada" de procesos que mantiene la

inflamación activa.

Además hay que recordar que el "pool" de eosinófilos circulantes representa sólo la menor parte del total^{113,142}, y que una parte de la ECP medida en suero procede de los eosinófilos no circulantes, por lo que los niveles séricos de ECP es probable que no sean idóneos para estimar el número de eosinófilos periféricos, pudiendo reflejar sin embargo (como quedó referido en la hipótesis previa), la actividad biológica y el "turnover" de los mismos¹⁴².

En nuestro trabajo es de destacar la escasa cantidad de pacientes (16%) que presentaban cifras absolutas de eosinófilos en rango de eosinofilia, mientras que los niveles de ECP estaban elevados en una proporción significativamente mayor (40%), lo que puede indicar la importancia de establecer el grado de activación de los mismos y no su simple número.

Por otro lado los niveles de ECP descendieron de forma significativa en todos los grupos tras tratamiento con corticoides. Este descenso fue más acentuado en las primeras tres semanas de tratamiento, en los que presentaron niveles basales mayores y tras tratamiento con corticoides orales.

Cuando consideramos los valores absolutos hay que señalar que todos los casos con valores mayores de 15µg/l (valor que consideramos límite superior de normalidad) descendieron tras tratamiento.

Han sido ampliamente reseñados los efectos que producen los corticoides sobre la reacción inflamatoria como son reducir la permeabilidad vascular, inhibir la producción de citoquinas,

prevenir la migración directa y activación de las células inflamatorias, limitar la degranulación celular, ect. Igualmente, es conocido desde hace años cómo los niveles séricos de eosinófilos pueden descender tras tratamiento con corticoides inhalados o vía oral. Sin embargo, en otros estudios se subraya que en pacientes con asma moderado se reducen en mayor medida los niveles de mediadores liberados por los eosinófilos que su propio número, pudiendo esto indicar que la secreción de proteínas granulares y en concreto la ECP es más sensible a los glucocorticoides que la migración o tráfico de estas células, y por tanto que su número^{59,174}. Los resultados de nuestro estudio apuntan en esa dirección, puesto que no hallamos diferencias significativas en el número de eosinófilos séricos tras el tratamiento, mientras han quedado reflejadas estas diferencias en los niveles de ECP.

Estos hallazgos están, pues, en consonancia con lo indicado por Venge¹⁷⁴ o Adelroth⁵⁹ que sugieren la importancia de estimar los niveles de los mediadores inflamatorios, tanto a nivel sérico como en BAL, y su descenso tras tratamiento, como indicadores de actividad de los eosinófilos e inhibición de la misma tras la terapia.

Asimismo, la correlación que encontramos entre los niveles de ECP y la cifra de eosinófilos antes del inicio del tratamiento, no se halló al finalizar el mismo, debido al importante descenso en los niveles de ECP, con relativo mantenimiento de la cifra de eosinófilos. Esto apunta en el sentido de hipótesis referida del mayor efecto de los corticoides sobre la inhibición de la activación y ulterior degranulación de los eosinófilos, que sobre

el número de los mismos, probablemente por la inhibición de la secreción de las interleucinas que median esta activación.

En todos los grupos encontramos significativa mejoría clínica en la mayoría de los pacientes tras el tratamiento (estimada por los índices medios de evolución clínica cercanos a 1), siendo esta mejoría total en los tratados con corticoides orales.

Sin embargo, a diferencia de algunos trabajos^{133,167} y en consonancia con otros^{164,165}, no obtuvimos buena correlación de los niveles de ECP con los parámetros funcionales evaluados, pudiendo esto deberse, por un lado, a la poca afectación funcional basal de nuestros pacientes (como sucede en los estudios donde no se obtiene esta correlación) y por otro, a la variabilidad propia de los valores funcionales en el asma sintomático. Hay que recordar la afirmación ya tradicional, aunque no por ello menos cierta, de que la obstrucción en el asma es variable y reversible. Variable en cuanto a que se modifica espontáneamente, o con la simple maniobra de su determinación. Reversible en cuanto a que mejora por la acción de un fármaco broncodilatador, o de forma natural. Aún cuando es ostensible esta variabilidad clínica y funcional no es menos cierto, a la luz de los conocimientos actuales, que además puede coexistir un sustrato inflamatorio permanente, que sea causante de posteriores "agudizaciones" y "obstrucciones" y que lleve a un deterioro clínico-funcional progresivo. Es aquí donde los antiinflamatorios pueden tener una actuación más notable, rompiendo el círculo vicioso de liberación de mediadores, y es donde podemos considerar la estimación en suero de ECP, como parámetro

biológico para monitorizar la actividad inflamatoria y la posterior efectividad de la terapia.

Pero también hay que reseñar la propia variabilidad interindividual de los valores de ECP, reflejo de los múltiples factores que inciden en el asma bronquial.

Así, la inflamación de la vía aérea, aunque destacable, no es el único factor que interviene en la patogénesis de la enfermedad asmática.

Por ello debemos considerar el "perfil" de los pacientes en los que la estimación de la ECP pudiera ser más rentable para monitorizar la efectividad del tratamiento: éste sería un asmático extrínseco, con niveles de ECP basales elevados ($>15\mu\text{g/l}$), sin tratamiento previo y clínicamente inestable. En este grupo de pacientes los niveles de ECP y su evolución tras tratamiento constituyen un índice biológico sensible de actividad inflamatoria y respuesta al tratamiento.

Así pues, la efectiva monitorización de los niveles de ECP nos podría servir, en su caso, para estimar si las dosis de tratamiento antiinflamatorio están siendo las suficientes o es necesario su incremento o, para evaluar si son necesarios (si los niveles de ECP descienden y se mantiene la inestabilidad clínica) otros fármacos como anticolinérgicos, β_2 agonistas de larga duración, teofilinas, ect, que incidan en otros factores patogénicos y no simplemente en la inflamación. Esta medición, como indica recientemente Zimmerman²⁷⁶, podría ser de especial utilidad en niños donde, dados los posibles efectos secundarios del tratamiento corticoideo prolongado, es necesaria una

evaluación más exhaustiva y prudente de su eficacia clínica, siendo, pues, la población en que puede ser más beneficioso el disponer de un marcador cuantificable de actividad inflamatoria.

Es necesario indicar, por último, que los niveles de ECP son marcadores biológicos de actividad inflamatoria, pudiendo servir de apoyo para la toma de las decisiones terapéuticas subrayadas, pero sin menoscabo, (como resulta obvio) de la trascendencia de los parámetros clínicos y funcionales, que serán los más valiosos para evaluar la efectividad del tratamiento antiinflamatorio.

CONCLUSIONES

1ª) Hemos encontrado niveles séricos de Proteína Catiónica del Eosinófilo (ECP) significativamente mayores en los pacientes con asma bronquial y/o rinitis alérgica que en la población normal, lo cual probablemente esté en relación con la existencia de actividad inflamatoria en el tracto respiratorio de los pacientes.

2ª) Estas diferencias se mantienen para los distintos grados de severidad clínica estimados siguiendo el Consenso Internacional, así como para los grupos estimados según la sensibilización alérgica.

3ª) Los niveles séricos de ECP descienden de forma significativa tras el tratamiento con corticoides inhalados, vía oral o tópicos vía nasal, relacionándose con la buena evolución de la sintomatología clínica, mientras que no desciende significativamente el número de eosinófilos.

Este descenso es mayor en los pacientes agudizados, no tratados previamente y con valores de ECP elevados.

4ª) Por todo lo anterior, el nivel sérico de ECP parece ser un parámetro biológico apreciable de actividad inflamatoria, y su estimación seriada podría servirnos para monitorizar la eficacia del tratamiento antiinflamatorio y, junto a la evolución clínico-funcional, como apoyo para la toma de decisiones terapéuticas.

5ª) Debido a los problemas de aplicación práctica de la técnica, no creemos que los niveles séricos de ECP se puedan utilizar de forma generalizada como predicción de deterioro de la enfermedad asmática o rinitica, al ser necesaria su estimación frecuente para este objetivo.

6ª) No hemos hallado correlación entre los niveles de ECP y los parámetros funcionales o de atopia evaluados.

7ª) Hemos encontrado buena estabilidad de la ECP congelando el suero a -20°C , por lo que creemos es suficiente su conservación a esta temperatura.

RESUMEN

Como se ha indicado en los últimos años, la inflamación parece desempeñar un papel fundamental en la patogénesis del asma bronquial y rinitis alérgica. Son múltiples las células y mediadores liberados por ellas que participan en este fenómeno inflamatorio, con interrelaciones complejas y con efectores finales, causantes de daño tisular.

Estas células y mediadores han sido estudiados en muestras de biopsias bronquiales, líquidos de lavado broncoalveolar (BAL), lavados nasales y suero, estableciéndose su relación con parámetros clínico-funcionales.

Hay múltiples evidencias que señalan que el eosinófilo es una de las principales células implicadas, demostrándose su participación fundamental en la respuesta de fase tardía a antígenos inhalados. Esta célula contiene en sus gránulos cuatro proteínas mayores: Proteína Básica Mayor (MBP); Neurotoxina Derivada de los eosinófilos (EDN) o Proteína X; Peroxidasa Eosinofílica (EPO) y Proteína Catiónica del Eosinófilo (ECP), que son liberadas al medio extracelular tras su estimulación antigénica. Entre ellas, la ECP parece ser la más potente para producir daño tisular, habiéndose establecido una buena correlación entre la severidad del asma y los niveles de ECP en estudios realizados en BAL y suero.

Por otra parte se ha observado una buena correlación entre los niveles de ECP en el BAL y suero de los pacientes asmáticos, lo que apunta que los niveles séricos pueden reflejar lo que sucede a nivel local.

Por último se ha indicado que los valores de ECP pueden descender tras tratamiento antiinflamatorio inhalado, tópico nasal o vía sistémica, lo que sugiere que estos niveles séricos de ECP podrían ser utilizados para monitorizar la actividad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento antiinflamatorio utilizado.

Para establecer los niveles de ECP en la población de nuestro medio y evaluar la anterior posibilidad, hemos realizado un estudio en el que analizamos los sueros de 139 personas: un grupo control de 53 personas sanas y 86 pacientes con asma bronquial y/o rinitis alérgica. Se evaluó la situación atópica, clínico-funcional, los niveles de ECP y eosinófilos. Comparamos los niveles medios de ECP entre el grupo control y de pacientes globalmente, y según la gravedad clínica o sensibilidad alérgica que presentaron. Se realizó un seguimiento mensual de estos pacientes, durante una media de 162 ± 43 días, con estimación de la evolución clínico-funcional y de los niveles de ECP y eosinófilos. Los pacientes que presentaron reagudización (60) entraron en 4 grupos de tratamiento (becometasona inhalada, beclometasona inhalada + budesonida nasal, budesonida nasal sólo ó beclometasona inhalada + deflazacor oral), según su sintomatología y la gravedad de la misma, siendo medidos los niveles de ECP y eosinófilos basalmente y a los 21-30 ó 60 días. Hemos obtenido unos niveles de ECP séricos de $9,34 \pm 5,76$ $\mu\text{g/l}$ en la población control, $18,29 \pm 18$ en los asmáticos y $14,76 \pm 10,94$ en los riníticos, existiendo diferencias significativas entre estos 2 grupos y el control, así como entre los diversos conjuntos

establecidos según la gravedad clínica ó sensibilidad alérgica y el grupo de personas sanas. Por último, encontramos diferencias significativas entre los asmáticos estables (leves) e inestables (moderados) clínicamente. No encontramos diferencias significativas en el número de eosinófilos séricos entre estas poblaciones.

Los niveles de ECP descendieron significativamente en todos los grupos de tratamiento antiinflamatorio, con una mayor disminución en los que tenían mayores niveles basales, y en los tratados con corticoides orales. Este descenso se asoció a evolución clínica favorable, aunque no pudimos establecer correlaciones con parámetros funcionales, probablemente debido a la variabilidad de éstos, y quizás por la poca afectación funcional basal de los pacientes evaluados. Los niveles de eosinófilos descendieron, aunque no de forma significativa.

Pudimos comprobar en un 10% de pacientes que los niveles de ECP podían predecir la reagudización clínica.

Por último evidenciamos la buena estabilidad de la ECP, conservada a -20°C , no existiendo diferencias significativas en sus niveles al conservarla a -70° , ni tras un periodo de hasta 235 días a -20°C .

Concluimos que los niveles séricos de ECP pueden ser marcadores biológicos de actividad inflamatoria a nivel bronquial, que su medición seriada podría ser útil para la monitorización de esta actividad y para evaluar el efecto de los fármacos que la suprimen. Esta monitorización sería más beneficiosa en pacientes agudizados, no tratados, con niveles de ECP basales elevados y

especialmente útil en los niños.

Sin embargo, para finalizar, es necesario subrayar que en el asma subyacen otros fenómenos patogénicos además del inflamatorio, que la misma inflamación presenta mecanismos sumamente complejos y que, necesariamente, en toda investigación de éstos, hemos de ser cautos a la hora de extrapolar los resultados, por lo que, sin que pierdan validez los mismos, siempre nos ha de quedar la duda de si los hechos acontecidos pudieran explicarse por otras causas que se han escapado a la propia observación.

BIBLIOGRAFIA

1. Ciba Foundation Guest Symposium. Thorax 1959; 44:286-99.
2. American Thoracic Society. Am Rev Respir Dis 1962; 85:762-68.
3. Ciba Foundation Study Group No. 38. The identification of asthma. Edinburgh and London: Churchill Livingstone. 1971.
4. Orié NGM, Sluiter HJ, De Vries K, Tammeling GJ, Witkop J. The host factor in bronchitis. In: Bronchitis: an international symposium, 27-29 April 1960, Groningen. Assen: Royal Van Gorcum 1961: 43-59.
5. Van der Lende R, De Kroon JPM, Van der Meulen GG et al. Possible indicators of endogeneous factors in the development of CNSLD. In Orié NGM, Van der Lende R, eds. Bronchitis III. Proceedings of the 3rd International symposium on bronchitis, 23-26 September 1969, Groningen. Assen: Royal Van Gorcum 1970: 52-70.
6. Howell JBL. Introducción y perspectivas históricas En: El papel de los procesos inflamatorios en la hiperreactividad de las vías aéreas. Ed ST Holgate. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1991: 1-3.
7. Consenso Internacional sobre el diagnóstico y tratamiento del asma. National heart, lung and blood institute, National institute of health. Publication N° 92-3091, march 1992.
8. Stephens NL. Airway smooth muscle and disease workshop: structure and mechanical properties. Am Rev Respir Dis 1987; 136: 1-7.
9. Marthan R, Woolcock J. Is a myogenic response involved in deep inspiration- induced bronchoconstriction in asthmatics?. Am Rev Respir Dis 1989; 140: 1354-58.
10. Rasmussen H, Takuwa Y, Park S. Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. Faseb j 1987; 1:177-85.
11. Barnes PJ. Neural control of human airways in health and disease. Am Rev Respir Dis 1986; 134: 1289-314.
12. Barnes PJ. Airway inflammation and autonomic control. Eur J Respir Dis 1986; 691 (Suppl. 147): 80-7.
13. Barnes PJ. Cholinergic control of airway smooth muscle. Am Rev Respir Dis 1987; 136: S42-S54.
14. Barnes PJ. Adrenoceptors in bronchial asthma. In: Szbadi E, Bradshw CM, Nahorski SR. Eds pharmacology of adrenoceptors. London: Macmillan 1985; 205-14.
15. Barnes PJ. Non-adrenergic, non cholinergic neural control of human airways. Arch Int Pharmacodyn 1986; 230(suppl.): 208-28.
16. Pellegrino R, Violante B, Crimi E, Brusasco V. Time course and calcium dependence of sustained bronchoconstriction induced by deep inhalation in asthma. Am Rev Respir Dis 1991; 144: 1262-66.

17. Souhrada M, Shourada JK. Sensitization-induced sodium influx in airway smooth muscle cells of guinea pigs. *Respir Physiol* 1985; 60: 157-68.
18. Dreborg S. Fisiopatología de las pruebas cutáneas. *Allergy* 1989; 44 (supl.10): 13-21.
19. Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, et al. Mucosal inflammation in asthma. State of the art. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 434-57.
20. Crockcroft DW. Mechanism of perennial allergic asthma. *The Lancet* 1983; 30: 253-55.
21. Howarth PH, Durham SR, Lee TH, Kay AB, Church MK, Holgate ST. Influence of albuterol, cromolyn sodium and ipatropium bromide on the airway and circulating mediator responses to allergen bronchial provocation asthma. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 986-92.
22. Church MK. The role of basophils in asthma. Sodium cromoglycate on histamine release and content. *Clin Allergy* 1982; 12:223-8.
23. Joseph M, Tonnel AB, Torpier G, Capron A, Arnoux B, Benveniste J. Involvement of immunoglobulin E in the secretory process of alveolar macrophages from asthmatic patients. *J Clin Invest* 1983; 71: 221-30.
24. Melewicz FM, Spiegelberg HL. Fc receptors for IgE on a subpopulation of human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 1980; 125: 1026-31.
25. Capron M, Caporn A, Dessaint JP, Torpier GS, Johansson SG, Prin L. Fc receptors for IgE on human and rat eosinophils. *J Immunol* 1981; 126: 2087-92.
26. Capron A, Ameisen JC, Joseph M, Auriault C, Tonnel AB, Caen J. New functions for platelets and their pathological implications. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; 77: 107-14.
27. Ludin C, Hofstetter H, Sarfati M, et al. Cloning and expression of the DNA coding for a human lymphocyte IgE receptor. *EMBO J* 1987; 6: 109-14.
28. Holgate ST, Robinson C, Church MK. Mediadores de la hipersensibilidad inmediata. In: Mideleton E, Freed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW: *Alergia. Principios y prácticas*. Tomo I. Barcelona 1992; 128-54.
29. Crockcroft DW, Murdock KY. Comparative effects of inhaled salbutamol, sodium cromoglycate and beclomethasone dipropionate on allergen-induced early asthmatic response, and increased bronchial responsiveness to histamine. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79: 734-40.

30. Kay AB, Henson PM, Hunninghake GW, Irvin C, Lichtenstein LM, Nadel JA. Cellular Mechanism In: The role of inflammatory processes in airway hyperresponsiveness. Ed. ST Holgate. Blackwell Scientific Publications. Oxford 1991; 161-89.

31. Borish L, Joseph BZ. Inflammation and the allergic response. Med Clin Northam. 1992; 76/4: 765-87.

32. Cosio MG, Hale KA, Niewoehner DE. Morphologic and morphometric effects of prolonged cigarette smoking in the small airways. Am Rev Respir Dis 1980; 122: 265-71.

33. Gilljan H, Motakefi A, Robertson B, Strandwik B. Ultrastructure of the bronchial epithelium in adult patients with cystic fibrosis. Eur J Respir Dis 1987; 71: 187-94.

34. Kerrebijn KF, Howell JBL, Jongejan RC, Postma DS, Sears MR, Woolcock AJ. Exposición clínica. En: El papel de los procesos inflamatorios en la hiperreactividad de las vías aéreas. Ed Holgate. Blackwell Scientific Publications. Oxford 1991. 4-40.

35. Dunnill MS. The pathology of asthma with special reference to changes in the bronchial mucosa. J Clin Pathol 1960; 13:27.

36. Heard BE, Hossain S. Hyperplasia of bronchial muscle in asthma. J Path 1973; 110: 319.

37. Kleinerman J, Adelson L. A study of asthma deaths in a coroner's population. J Allergy Clin Immunol 1987; 80: 406-9.

38. Messer JW, Peters GA, Bennett WA. Causes of death and pathologic findings in 304 cases of bronchial asthma. Dis Chest 1960; 38: 616-24.

39. Goug J. Postmortem differences in "asthma" and in chronic bronchitis. Acta Allergol 1961; 16:391-99.

40. Takizawa T, Thurlbeck WM. Muscle and mucous gland size in the major bronchi of patients with chronic bronchitis, asthma, and asthmatic bronchitis. Am Rev Respir Dis 1971; 104: 331-36.

41. Filley WV, Holley KE, Kephart GM, Gleich GJ. Identification by immunofluorescence of eosinophil granule major basic protein in lung tissues of patients with bronchial asthma. Lancet 1982; 2:11-16.

42. Gleich GJ, Motojima S, Frigas E, Kephart GM, Fujisawa T, Kravis LP. The eosinophilic leukocyte and the pathology of fatal bronchial asthma: evidence for pathologic heterogeneity. J Allergy Clin Immunol 1987; 80: 412-15.

43. Earle BV. Fatal bronchial asthma: a series of fifteen cases with a review of the literature. Thorax 1953; 8: 195-206.

44. Laitinen LA, Heino M, Laitinen A, Kava T, Haahtela T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. Am Rev Respir Dis 1985; 131: 599-606.

- 45.Laitinen LA, Laitinen A. Mucosal inflammation and bronchial hyperreactivity. *Eur Respir J* 1988; 5: 488-89.
- 46.Poston RN, Chanez P, Lacoste JY, Litchfield T, Lee TH, Bousquet J. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrate in asthmatic bronchi. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 145:918-21.
- 47.Poulter LW, Power C, Burke C. The relationship between bronchial immunopathology and hyperresponsiveness in asthma. *Eur Respir J* 1990; 3:792-99.
- 48.Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley A, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326:298-304.
- 49.Lozewicz S, Gómez E, Fergusson H, Davies RJ. Airway inflammatory cells in mild asthma. *BMJ* 1988; 297:1515-16.
- 50.Reid LM, Gleich GJ, Hogg J, Kleinerman J, Laitinen LA. Patología En: El papel de los procesos inflamatorios en la hiperreactividad de las vías aéreas. Ed Holgate. Blacwell Scientific Publications. Oxford 1991; 41-86.
- 51.Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I et cols. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* (11) 1990; 323:1033-39.
- 52.Aas K. Heterogeneity of bronchial asthma: sub-populations- or different stages of the disease. *Allergy* 1981; 36:3-14.
- 53.Bousquet J, Chanez P, Campbell AM, Lacoste JY, Poston R, Enander I, Godard P, Michel F. Inflammatory processes in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1991; 94:227-32.
- 54.Flint KC, Leung KBP, Hudspith BN, Bostoff J, Pearce FL, Johnson N. Bronchoalveolar mast cells in extrinsic asthma: a mechanism for the initiation of antigen specific bronchoconstriction. *Br Med J* 1985; 291:923.
- 55.Tomioka M, Ida S, Shindoh Y, Ishihara T, Takishima T. Mast cells in bronchoalveolar lumen of patients with bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis* 1984; 129:1000-1005.
- 56.Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ, Collins JV, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma: relationship to bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 62-69.
- 57.Kelly C, Ward C, Stenton CS, Bird G, Hendrick DJ, Walters EH. Number and activity of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid in asthma and their relation to airway responsiveness. *Thorax* 1988; 43:684-692.

58. Casale TB, Wood D, Richardson HB, Trapp S, Metzker WJ, Zavala D, Hunninghake GW. Elevated bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in allergic asthmatics are associated with methacholine bronchial hyperresponsiveness. *J Clin Invest* 1987; 79:1197-1203.
59. Ädelroth E, Rosenhall L, Johansson S, Linden M, Venge P. Inflammatory cells and eosinophilic activity in asthmatics investigated by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:91-99.
60. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Enander I, Venge P, Peterson CA et cols. Indirect evidence of bronchial inflammation assessed by titration of inflammatory mediators in BAL fluid of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:649-60.
61. Lee TH, Brown MJ, Naggy L, Causon R, Ealport MJ, Kay AB. Exercise-induced release of histamine and neutrophil chemotactic factors in atopic asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 70:73-81.
62. Casale TB, Wood D, Richerson HB, Zehr B, Zavala D, Hunninghake GW. Direct evidence of a role for mast cells in the pathogenesis of antigen-induced bronchoconstriction. *J Clin Invest* 1987; 80:1507-11.
63. De Monchy JG, Keyzer JJ, Kauffman HF, Beaumont F, De Vries K. Histamine in late asthmatic reactions following house dust mite inhalation. *Agents Actions* 1985; 16:252-55.
64. Otsuka H, Denburg JA, Befus D et al. Effect of beclomethasone dipropionate on nasal metachromatic cell subpopulations. *Clin Allergy* 1986; 16:589-95.
65. Lee TH, Assoufi BK, Kay AB. The link between exercise, respiratory heat exchange, and the mast cell in bronchial asthma. *Lancet* 1983; 1:520-22.
66. Durham SR, Kay AB. Eosinophils, bronchial hyperreactivity and late-phase asthmatic reactions. *Clin Allergy* 1985; 15:411-18.
67. De Monchy JG, Kauffman HF, Venge P et al. Bronchoalveolar eosinophils during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131:373-76.
68. Frew AJ, Kay AB. The relationship between infiltrating CD4+ lymphocytes, activated eosinophils and the magnitude of the allergen-induced late phase cutaneous reaction. *J Immunol* 1988; 141:4158-64.
69. Crimi E, Chiaramondia M, Milanese M, Rossi GA, Brusasco V. Increased numbers of mast-cells in bronchial mucosa after the late-phase asthmatic response to allergen. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144(6):1282-86.
70. Galli SJ et cols. New concepts about the mast cell (review). *N Engl J Med* 1993; 328:257-65.

71. Capron M, Jouault P, Prin C et al. Functional study of a monoclonal antibody to IgE-Fc receptor of eosinophils, platelets and macrophages (FCεR2). *J Exp Med* 1986; 164:72-89.
72. Metzger WJ, Zavala D, Richerson HB et al. Local allergen challenge and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic lungs. Description of the model and local airway inflammation. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:433-40.
73. Calhoun WJ, Reed HE, Moest DR, Stevens CA. Enhanced superoxide production by airway inflammation, and alveolar macrophage density changes after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145(2pt1) 317-25.
74. Kay AB, Diaz P, Carmichael J, Grant IWB. Corticosteroid-resistant chronic asthma and monocyte complement receptors. *Clin Exp Immunol* 1981; 44:576-80.
75. Haslett C, Henson PM. Resolution of inflammation. In: Clark RAF, Henson PM, eds. *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York: Plenum Publishing 1988; 185-211.
76. Moqbel R, Durham SR, Shaw RJ et al. Enhancement of leukocyte cytotoxicity after exercise-induced asthma. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:609-13.
77. Carroll M, Durham SR, Wals GM, Kay AB. Activation of neutrophils and monocytes after allergen- and histamine-induced bronchoconstriction. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75:290-6.
78. Boschetto P, Fabbri LM, Zocca E et al. Prednisone inhibits late asthmatic reactions and airway inflammation induced by toluene diisocyanate in sensitized subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80:261-7.
79. Tanizaki Y, Kitani H, Okazaki M, Mifune T, Mitsurobu F, Honke N. Clinical effects of complex spa therapy on patients with steroid-dependent intractable asthma (SDIA). *Arerugi*. 1993 42(3pt1) 219-27.
80. Tanikazi Y, Kitani H, Okazaki M et al. Cambios en las propiedades de los linfocitos-neutrófilos y células basofílicas broncoalveolares y en la liberación de histamina y leucotrienos por las células alveolares en pacientes con asma corticodependiente inestable. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 101/2:196-202.
81. Tanikazi Y, Kitani H, Okazaki H, Mifune F, Mitsunobu F, Kimura T. Effects of long-term glucocorticoid therapy on bronchoalveolar cells in adult patients with bronchial asthma. *J. Asthma* 1993; 30(4):309-18.
82. Sur S, Crotty TB, Kephart GM, Hyma DA, Colby TV, Reed CR, Hunt LW, Gleich GJ. Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa?. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148/3:713-19.

83. Jeffery PK, Nelson FC, Wardlaw AJ, Kay AB. Quantitative analysis of bronchial biopsies in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:A316.
84. Corrigan CJ, Kay AB. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol Today* 1992; 13(12):501-7.
85. Corrigan CJ, Kay AB. Asthma. Role of T-lymphocytes and lymphokines. *Br Med Bull* 1992; 48(1): 72-84.
86. Robinson DS, Bentley AM, Hartnell A, Kay AB, Durham SR. Activated memory T helper cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma, relation to asthma symptoms, lung function and bronchial responsiveness. *Thorax* 1993; 48(1): 26-32.
87. Del Prete G. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy* 1992; 47(5):450-5.
88. Goldstein RA, Paul WE, Metcalfe DD, Busse WW, Reece ER. NIH conference. Asthma. *Ann Intern Med* 1994; 121(9):698-708.
89. Walker C, Kaegi MK, Braum P, Blaser K. Activated T-cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma, correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88(6):935-42.
90. Corrigan CJ, Haczku A, Gemou-Engesaeth et al. C4 T-lymphocyte activation in asthma is accompanied by increased serum concentrations of interleukin-5. Effect of glucocorticoid therapy. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147/3: 540-47.
91. Mazzone L, Morley J, Page CP, Sanjar S. Induction of airway hyperreactivity by platelet activating factor in the guinea-pig. *J Physiol* 1985; 365:107P.
92. Metzger WJ, Hunninghake GW, Richerson HB. Late asthmatic reactions; inquiry into mechanisms and significance. *Clin Rev Allergy* 1985;3:145-65.
93. Averill FJ, Hubbard WC, Proud D et al. Platelet activation in the lung after antigen challenge in a model of allergic asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145/3:571-76.
94. Hunter JA, Finkbeiner WE, Nadel JA, Goetzl EJ, Holtzman MJ. Predominant generation of 15-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid by epithelial cells from human trachea. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:4633-7.
95. Philips MJ, Gold WM, Goetzl EJ. IgE-dependent and ionophore-induced generation of leukotrienes by dog mastocytoma cells. *J Immunol* 1983; 131:906-10.
96. Bruynzeel PLB, Kok PTM, Vretor RJ, Verhagen J. On the optimal conditions of LTC4 formation by human eosinophils in vitro. *Prostaglandins Leukotrienes Med* 1985; 20:11-22.

97. Campbell AM, Chanez P, Vignola AM et al. Functional characteristics of bronchial epithelium obtained by brushing from asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147/3:529-34.
98. Davies RJ, Devalie JL. Células epiteliales. *Br Med Bull* 1992; 48/1:85-96.
99. Jones TW. The blood-corpuscle considered in its different phases of development in the animal series, Memoir I. Vertebrata, *Philos. Trans. R. Soc. London*. 1846; (Part 1):63.
100. Hirsch JG and Hirsch BI: Paul Ehrlich and the discovery of the eosinophil. In Mahmoud, AAF, and Austen KF, editors: *The eosinophil in health and disease*, New York, 1980, Grune & Stratton, Inc., p. 3.
101. Kay AB, Corrigan CJ. Asthma. Eosinophils and neutrophils. *Br Med Bull* 1992; 48(1): 51-64.
102. Smith H. Asthma, inflammation, eosinophils and bronchial hyperresponsiveness. *Clin Exp Allergy* 1992; 22(2): 187-97.
103. Frigas E, Gleich GJ. The eosinophil and the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77:527-37.
104. Ahlstedt S, Enander I, Peterson C, Rak S, Venge P. Clinical assessment of the inflammatory component of asthma with emphasis on the eosinophils. *Pharmaceutical Medicine* 1992; 6:99-111.
105. Picado C. Respuestas asmáticas precoces y tardías: una hipótesis: *Allergy Eur Allergy Clin Immunol* 1992; 47(41):331-33.
106. Slifman NR, Adolphson CR, Gleich GJ. Eosinófilos: aspectos bioquímicos y celulares. In: Middleton E, Freed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW: *Alergia. Principios y práctica*, pp: 169-194. Versión española de la tercera edición de la obra original en lengua inglesa. Tomo I. Salvat editores SA Barcelona. 1992.
107. Metcalf, D.: The molecular biology and functions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 1986. 67:257.
108. Kato M, Liu MC, Stealey BA, Friedman B, Lichtenstein LM, Permutt S, Schleimer RP. Production of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in human airways during allergen-induced late-phase reactions in atopic subjects. *Lymphokine Cytokine Res*. 1992; 11(6):287-92.
109. Broide DH, Paine MM, Firestein GS. Eosinophils express interleukin 5 and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics. *J Clin Invest* 1992; 90(4). 1414-24.

110. Moqbel R, Hamid Q, Ying S, Barkans J, Hartnell A, Tsicopoulos A, Wardlaw AJ, Kay AB. Expression of mRNA and immunoreactivity for the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in activated human eosinophils. *J Exp Med* 1991; 174(3):749-52.
111. Wardlaw AJ. Eosinophils in the 1990s: new perspectives on their role in health and disease. *Postgrad Med J* 1994; 70(826):536-52.
112. Sousa AR, Poston RN, Lane SJ et al. Detection of GM-CSF in asthmatic bronchial epithelium and decrease by inhaled corticosteroid. *Am Rev Respir Dis* 1993;147/6: 1557-61.
113. Osgood EE. Number and distribution of human hemic cells. *Blood* 1954; 9:1141.
114. Escudero A, Hernández J. Rentabilidad diagnóstica de la cuantificación de las proteínas del eosinófilo. Revisión. *Allergol e immunopathol* 1993 ;21, 6:233-240.
115. Nutman TB, Cohen SG, Ottesen EA: Los eosinófilos, la eosinofilia y patologías relacionadas con los eosinófilos. II. Infiltrado eosinófilo y función. *Allergy Proc* 1989 III(3):37-43.
116. Howart PH, Djukanovic R, Walls A, Wilson J, Roche W, Holgate ST. Futuras perspectivas en los estudios antiinflamatorios. *Eur Respir Rev* 1991, 1, 4:278-283.
117. Wegner CD, Rothelein R, Clarke CC, Haynes N, Torcellini CA, La plante AM, Averill DR, Letts LG, Gundel RH et al. Inhaled anti-intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) reduces antigen-induced airway hyperresponsiveness in monkeys. *Am Rev Respir Dis*, 1991; 143:A148.
118. Montefort S, Roche WR; Howarth PH, Djukanovic R, Gratziau C, Carroll M, Smith L, Britten KM, Haskard D, Lee TH et al. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) expression in the bronchial mucosa of normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1992; 5(7): 815-23.
119. Gosset P, Tillie-Leblond I, Janin A, Marquette CH, Copin MC, Wallaert B, Tonnel AB. Expression of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 on bronchial biopsies from allergic and non-allergic asthmatic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 106(1):69-77.
120. Venge P, Carlson M. Eosinophil granule proteins in bronchial asthma. In: Kay AB. *Eosinophils, Allergy and asthma*. pp 96-105. 1st. Edition. Blackwell Scientific Publications. London, 1990.
121. Walsh GM, and Kay AB. Binding of immunoglobulin classes and subclasses to human neutrophils and eosinophils. *Clin Exp Immunol* 1986; 63:466.
122. Gleich GJ, Adolphson CR. The eosinophilic leukocyte, structure and function. *Adv Immunol* 1986; 39:177.

123. Ackerman SJ, Loegering DA, Venge P, et al. Distinctive cationic proteins of the human eosinophil granule: major basic protein, eosinophil cationic protein, and eosinophil-derived neurotoxin. *J Immunol* 1983; 131:2977.
124. Frigas E, Loegering DA, and Gleich GJ. Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. *Lab Invest* 1980; 42:35.
125. Gleich GJ, Frigas E, Loegering A, Wassom DL, Steinmuller D. Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *J Immunol* 1979; 123: 2925-7.
126. Frigas E, Loegering DA, Solley GO, et al. Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin Proc* 1981; 56:345.
127. Holgate ST, Roche WR and Church MK. The role of the eosinophil in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: S66-S70.
128. Lam S, LeRiche J, Phillips D, Chan-Yeung M. Cellular and protein changes in bronchoalveolar lavage fluid after late asthmatic reaction in patients with red cedar asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80:44-50.
129. Zheutlin LM, Ackerman SJ, Gleich GJ, Thomas LL. Donor sensitivity to basophil activation by eosinophil granule major basic protein. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; 77:216-7.
130. Gleich GJ, Loegering DA, Kueppers F, Bajaj SP, Mann KG. Physicochemical and biological properties of the major basic protein from guinea pig eosinophil granules. *J Exp Med* 1974; 140: 313-31.
131. Gordon MH. Studies of the aetiology of lymphadenoma. In Rose research on lymphadenoma. Bristol 1932. John Wright Sons, Ltd.
132. 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.
133. Zimmerman B, Lanner A, Enander I, Zimmerman RS, Peterson CGB, Ahlstedt S. Total blood eosinophils, serum eosinophil cationic protein and eosinophil protein X in childhood asthma: relation to disease status and therapy. *Clinical and Experimental Allergy* 1993; 23:564-570.
134. Henderson WR, Jorg A and Klebanoff SJ. Eosinophil peroxidase-mediated inactivation of leukotrienes B₄, C₄ and D₄. *J Immunol* 1982; 128:2609.
135. Verhagen J, Bruynzeel PLB, Koedam JA et al. Specific leukotriene formation by purified human eosinophils and neutrophils *FEBS Lett.* 1984; 168:23.
136. Fukuda T, Dunnette SL, Reed CE et al. Increased numbers of hypodense eosinophils in the blood of patients with bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:981.

137.Kuo HP, Yu TR, YU CT. Hypodense eosinophil number relates to clinical severity, airway hyperresponsiveness and response to inhaled corticosteroids in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1994; 7(8):1452-59.

138.Tomassini M, Tsicopoulos A, Chuntai P, Gruart V, Tonnel AB, Prin L, Capro 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; 88:365-75.

139.López AF, Williamsom DJ, Gamble JR et al. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression, and survival. *J Clin Invest* 1986; 78:1220.

140.Olsson I, Venge P. Cationic proteins of human granulocytes.II. Separation of the cationic proteins of the granules of leukaemic myeloid cells. *Blood* 1974; 44:235-46.

141.Peterson CGB, Jörnvall H, Venge P. Purification and characterization of eosinophil cationic protein from normal human eosinophils. *Eur J Haematol* 1988; 40:415-23.

142.Venge P, Dahl R, Halgren R, Olsson I. Cationic proteins of human eosinophils and their role in inflammatory reactions. In: Mahmoud AA, Austen KF, Simon AJ, eds. *The eosinophil in health and disease*. Philadelphia: Grune & Stratton, 1980; 131-42.

143.Gleich GJ, Adolphson CR, Slitman LR, Loegering DA, McKean DJ. Purification, neurotoxic and enzymatic activities of human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein. In: Kay AB, ed. *Allergy and inflammation*. London: Academic Press 1987; 165-80.

144.Slifman NR, Loegering DA, McKean DJ and Gleich GJ. Ribonuclease activity associated with human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein. *J Immunol* 1986; 137:2913.

145.Tai P, Spry JF, Peterson CH, Venge P, Olsson I. Monoclonal antibodies distinguish between storage and secreted forms of eosinophil cationic protein. *Nature* 1984; 309:182-184.

146.Spry CJF, Tai P, and Barkans J. Tissue localization of human eosinophil cationic proteins in allergic diseases. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; 77:252.

147.Monteseirín J, Llamas E, Muñoz F, Bono MJ and Conde J. Relationship of blood EG2+ eosinophils in patients with bronchial asthma. *Allergol et immunopathol* 1993; 21,3:97-99.

148.Venge P, Dahl R and Hallgren R. Enhancement of factor XII dependent reactions by eosinophil cationic protein. *Thromb Res* 1979; 14:641.

149. Peterson CGB, Skoog V, and Venge P: Human eosinophil cationic protein (ECP and EPX) and their suppressive effects on lymphocyte proliferation. *Immunobiology* 1986; 171:1.
150. Djukanovic R, Wilson JW, Britten K, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR, Howarth PH, Holgate ST. Quantitation of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatic and healthy control subjects using immunohistochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:863-71.
151. Fukuda T, Nakajima H, Ohashi Y, Motojima S, Makino S. Role of eosinophils and lymphocytes in the pathogenesis of bronchial asthma. *Nippon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1993; 31, Suppl: 159-64.
152. Woolley KL, Adelroth E, Woolley MJ, Ellis R, Jordana M, O'Byrne PM. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor, eosinophils and eosinophil cationic protein in subjects with and without mild, stable, atopic asthma. *Eur Respir J* 1994; 7(9): 1576-84.
153. Venge P, Dahl R, Fredens K, Peterson C. Epithelial injury of human eosinophils. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: S54-7.
154. Venge P, Dahl R, Fredens K, Hällgren R, Peterson C. Eosinophil cationic protein (ECP and EPX) in health and disease. In: *Immunobiology of the eosinophil*. T Yoshida, M Torisu eds, Elsevier Publishing Co, Oxford, 1983, pp. 163-78.
155. Ayars GH, Altman LC, Gleich GJ, Loegering DA, Baker CD. Eosinophil-mediated pneumocyte injury. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81: 776-81.
156. Rak S, Björson A, Häkanson L, Sörenson S, Venge P. The effect of immunotherapy on eosinophil accumulation and production of eosinophil chemotactic activity in the lung of subjects with asthma during natural pollen exposure. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:878-88.
157. Ferguson A, Whitelaw M, Brown H. Correlation of bronchial eosinophil and mast cell activation with bronchial hyperresponsiveness in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90:609-13.
158. Kirby JG, Hargreave FE, Gleich GJ, O'Byrne PM. Bronchoalveolar cell profiles of asthmatic nonasthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:379-83.
159. Diaz P, Gonzalez MC, Galleguillos FR. Leukocytes and mediators in BAL during allergen-induced late-phase asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139:1383-89.
160. Trigg CJ, Manolitsas ND, Wang J, Calderon MA, Mcaulay A; Jordan SE, Herdman MJ, Jhalli N, Duddle JM, Hamilton SA et al. Placebo-controlled immunopathologic study of four months of inhaled corticosteroids in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150(1). 17-22.

161. Dahl R, Venge P, Olsson I. Variation of blood eosinophils and eosinophil cationic protein in serum in patients with bronchial asthma: studies during inhalation challenge test. *Allergy* 1978; 33:211-15.
162. Cookson WO, Craddock CF, Benson MK, Durham SR. Falls in peripheral eosinophil counts parallel the late asthmatic response. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139:458-62.
163. Venge P, Zetterström, Dahl R, Roxin LE, Olsson I. Low levels of eosinophil cationic proteins in patients with asthma. *lancet* 1977; 2:373-75.
164. Juntunen-Backman, Järvinen P, Sorva R. Serum eosinophil cationic protein during treatment of asthma in children. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92:34-8.
165. Fergusson A, Vaughan R, Brow H and Curtis C. Evaluation of serum eosinophilic cationic protein as a marker of disease activity in chronic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95:23-8.
166. Carlson M, Häkansson L, Kämpe M, Stalenheim G, Peterson CH, and Venge P. Degranulation of eosinophils from pollen-atopic patients with asthma is increased during pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89:131-39.
167. Griffin E, Häkansson, Formgren H, Jörgensen K, Peterson CH and Venge P. Blood eosinophil number and activity in relation to lung function in patients with asthma and with eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87:548-57.
168. Durham SR, Loegering DA, Dunnette S, Gleich GJ, Kay AB. Blood eosinophils and eosinophil-derived proteins in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84:931-6.
169. Venge P. Eosinophil activity in bronchial asthma. *Allergy Proc* 1994; 15(3): 139-41.
170. Zimmerman B, Enander I, Zimmerman R, Ahlstedt S. Asthma in children less than 5 years of age: eosinophil and serum levels of the eosinophil proteins ECP and EPX in relation to atopy and symptoms. *Clin Exp Allergy* 1994; 24(2):149-55.
171. Kuehr J, Frischer T, Barth R, Karmaus W, Kruger S, Meinert R, Urbanek R, Forster J. Eosinophils and eosinophil cationic protein in children with and without sensitization to inhalant allergens. *Eur J Pediatr* 1994; 153(10): 739-44.
172. Venge P, Henriksen J, Dahl R. Eosinophils in exercise-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:699-704.
173. Niggemann B, Kleinau I, Schmitt M, Wahn U. Twenty-four-hour time course of eosinophil granule proteins ECP and EPX during bronchial allergen challenges in serum of asthmatic children. *Allergy* 1994; 49(2):74-80.

- 174.Venge P, Dahl R. Are blood eosinophil number and activity important for the development of the late asthmatic reaction after allergen challenge?. *Eur Respir J* 1989; 2, Suppl 6:430-34.
- 175.Wempe JB, Tammeling EP, Köeter G, Hakansson L, Venge P, Postma D. Blood eosinophil numbers and activity during 24 hours: effects of treatment with budesonide and bambuterol. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90:757-65.
- 176.Rak-S. Effects of immunotherapy on the inflammation in pollen asthma. *Allergy* 1993; 48(17 Suppl):143-44.
- 177.Fahy JV, Wong HA, Boushey. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:1126-31.
- 178.Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey HA. Analysis of cellular and biochemical constituents of induced sputum after allergen challenge: a method for studying allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1994 93(6): 1031-39.
- 179.Claman DM, Boushey HA, Liu J, Wong H, Fahy JV. Analysis to induced sputum to examine the effects of prednisone in airway inflammation in asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94(5): 861-69.
- 180.Kapp-A. The role of eosinophils in the pathogenesis of atopic dermatitis-eosinophils granule proteins as markers of disease activity. *Allergy* 1993; 48(1): 1-5.
- 181.Paganelli R, Fanales-Belasio E, Scala E, Carmini D, Mezzaroma I, Pinter E, Aiuti F. Serum eosinophil cationic protein (ECP) in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:416-18.
- 182.Yamashita R, Kithara H, Kanemitsu T, Takeda T, Yamaguchi S. Eosinophil cationic protein in the sera of patients with *Mycoplasma pneumoniae*. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13(5): 379-81.
- 183.Garofalo R, Kimpen JLL, Welliver RC, Ogra PL. Eosinophil degranulation in the respiratory tract during natural acquired respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr* 1992; 120:28-32.
- 184.Hallgren R, Bjelle A, Venge P. Eosinophil cationic protein in inflammatory synovial effusions as evidence of eosinophil involvement. *Am Rheum Dis* 1984; 43: 556-62.
- 185.Hallgren R, Clombel JF, Dahl R, Fredens K, Kruse A, Jacobsen NO, Venge P, Rambaud JC. Neutrophil and eosinophil involvement of the small bowel in patients with Celiac disease and Crohn's disease: Studies on the secretion rate and immunohistochemical localization of granulocyte granule constituents. *Am J Med* 1989; 86:56-64.
- 186.Howard PH, Durham SR, Kay AB, Holgate ST. The relationship between mast cell-mediator release and bronchial reactivity in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80:703-11.

187. Kumlin M, Dahln B, Bjorck T et al. Urinary excretion of Leukotriene E4 and 11-dehydro-tromboxane B2 in response to bronchial provocation with allergen, aspirin, leukotriene D4 and histamine in asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146/1:96-103.
188. Draen JM, O'Brien J, Sparrow D et al. Recovery of leukotriene E4 from the urine of patients with airway obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:104-8.
189. Kikawa Y, Miyanomae T, Inoue Y et al. Urinary Leukotriene E4 after exercise challenge in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89/9: 1111-1119.
190. O'Hickey SP, Hawksworth RJ, Fong CY, Arm JP, Spur BW, Lee TH. Leukotrienes C4, D4, and E4 enhance histamine responsiveness in asthmatic airways. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:1053-7.
191. Shindo K, Matsumoto Y, Sumitomo M et al. Medición de leucotrieno C4 y D4 en la sangre arterial de pacientes asmáticos durante la remisión. *Ann Allergy* 1991; 66/6: 405-10.
192. Georgitis JW, Stone BD, Gottschlich G. Liberación de un mediador inflamatorio nasal en la rinitis alérgica a ambrosía: correlación con la afluencia celular en las secreciones nasales. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991; 96/3:231-37.
193. Pavord ID, Wong CS, Williams J, Tattersfield AE. Effect of inhaled Prostaglandin E2 on allergen-induced asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148/1: 87-90.
194. Gaddy JN, Margolskee DJ, Bush RK et al. Bronchodilation with a potent and selective Leukotriene D4 (LTD4) receptor antagonist (MK-571) in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146/2: 358-63.
195. Makker HK, Lau LC, Thomson HW, Binks SM, Holgate ST. The protective effect of inhaled leukotriene D4 receptor antagonist ICI 204, 219 against exercise induced asthma. *Am Rev respir Dis* 1993; 147: 1413-18.
196. O'Shaughnessy KM, Taylor IK, O'Connor B et al. Potent Leukotriene D4 receptor antagonist ICI 204,219 given by the inhaled route inhibits the early but not the late phase of allergen-induced bronchoconstriction. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147/6: 1431-35.
197. Cuss FM, Dixon CM, Barnes PJ. Effects of inhaled platelet activating factor on pulmonary function and bronchial responsiveness in man. *Lancet* 1986; II: 189-92.
198. Smith LJ, Rubin AH, Patterson R. Mechanism of platelet activating factor-induced bronchoconstriction in humans. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137(5):1015-19.
199. Dazen JM, Hirschman C, Macklem PT, Pauwels R, Permutt S, Persson C. Fisiología. En: El papel de los procesos inflamatorios en la hiperreactividad de las vías aéreas. Ed ST Holgate. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1991: 117-160.

200. Mosimann BL, White MV, Hohman RJ et al. Substance P, calcitonin gene-related peptide, and vasoactive intestinal peptide increase in nasal secretions after allergen challenge in atopic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92(11):95-104.
201. Joos GF, Germonpre PR, Kips JC, Peleman RA, Pauwels RA. Sensory neuropeptides and the human lower airways: present state and future directions. *Eur Respir J* 1994; 7(6): 1161-71.
202. Cushley MJ, Holgate ST. Adenosine induced bronchoconstriction in asthma; role of mast cell mediator release. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75:272-78.
203. Rafferty P, Beasley R, Southgate P, Holgate ST. The role of histamine in allergen and adenosine-induced bronchoconstriction. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 82(3-4):292-94.
204. Gómez de la Concha E, Fernández L, Marco F. Interacciones celulares en la respuesta inmune y su importancia en la clínica. En: Gómez de la Concha E. *Inmunología*. ed IDEPSA SA, Madrid 1992; 25-35.
205. Arm JP, Lee TH. The pathobiology of bronchial asthma. *Adv Immunol* 1992; 51P 323-82.
206. Ebisawa M, Liu MC, Yamada T, Kato M, Lichtenstein LM, Bochner BS, Schleimer RP. Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. II. Potentiation of eosinophil transendothelial migration by eosinophil-active cytokines. *J Immunol* 1994; 152(9): 4590-96.
207. Sonoda YM, Arai N, Ogawa M. Human regulation of eosinophilopoiesis in vitro; analysis of the targets of interleukin-3, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-5. *Leukemia*, 1989; 3:14-18.
208. Dubois GR, Bruijnzeel PL. IL-4 induced migration of eosinophils in allergic inflammation. *Ann Y Acad Sci* 1994; 28: 268-73.
209. Kips JC, Tavernier JH, Joos GF, Peleman RA, Pauwels RA. The potential role of tumor necrosis factor- in asthma. (Review). *Clin Exp Allergy* 1993; 23:247-50.
210. Abu-Ghazaleh RI, Kita H, Gleich GJ. Eosinophil activation and function in health and disease. *Immunol Ser* 1992; 57P 137-67.
211. Sehmi R, Wardlaw AJ, Cromwell O, Kurihara K, Waltmann P, Kay AB. Interleukin-5 selectively enhances the chemotactic response of eosinophils obtained from normal but not eosinophilic subjects. *Blood* 1992; 79(11): 2952-9.
212. Walker C, Bauer W, Braun RK, Menz G, Braun P, Schwarz F, Hansel TT, Villiger B. Activated T cells and cytokines in bronchoalveolar lavages from patients with various lung diseases associated with eosinophilia. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150(4): 1038-48.

213. Ohnishi T, Kita H, Weiler D et al. IL-5 is the predominant eosinophil-active cytokine in the antigen-induced pulmonary late-phase reaction. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147/4: 901-907.
214. Holgate ST, Djukanovic R, Wilson J, Roche W, Britten K, Howarth PH. Allergic inflammation and its pharmacological modulation in asthma. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991; 94(1-4): 210-17.
215. Robinson D, Hamid Q, Ying S et al. Prednisolone treatment in asthma is associated with modulation of bronchoalveolar lavage cell interleukin-4, interleukin-5 and interferon- γ cytokine gene expression. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148/2: 401-406.
216. Ramón Giménez JR. Bioquímica, producción y metabolismo de los radicales libres. En: *Radicales libres y antioxidantes en clínica humana*. Ed IDEPSA SA 1993; 12-22.
217. Kanazawa H, Kurihara N, Hirata K, Takeda T. The role of free radicals in airway obstruction in asthmatic patients. *Chest* 1991; 100: 1319-22.
218. Barnes PJ. Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 235-43.
219. Schleimer RP. Glucocorticoides. Mecanismos de acción y uso en enfermedades alérgicas. En: Middleton E, Fredd CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW: *Alergia. Principios y práctica*, pp 692-715. Versión española de la tercera edición de la obra original en lengua inglesa. Tomo I. Salvat editores SA Barcelona 1992.
220. Metcalf D. The granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Science* 1985; 226: 16.
221. Lampl KL, Lichtenstein LM and Schleimer RP. In vitro resistance to dexamethasone of basophils from patients receiving long-term steroid therapy. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 1015.
222. Pipkorn U. Effect of topical glucocorticoid treatment on nasal mucosal mast cell in allergic rhinitis. *Allergy* 1983; 38: 125.
223. Kelso A and Munck A. Glucocorticoid inhibition of lymphokine secretion by alloreactive T lymphocyte clones. *J Immunol* 1984; 133:784.
224. Pober JS, Bevilacqua MP, Mendrick DL et al. Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J Immunol* 1986; 136: 1680.
225. Clark RAF, Gallin JI, Fauci AS. Effects of in vivo prednisone on in vitro eosinophil and neutrophil adherence and chemotaxis. *Blood* 1979; 53: 633.

- 226.Schleimer RP, Davidson DA, Peters SP, Lichtenstein LM. Inhibition of basophil leukotriene release by antiinflammatory steroids. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; 77: 241.
- 227.Holgate ST, Hardy C, Robinson C et al. The mast cell as a primary effector cell in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77:274-82.
- 228.Dahl R, Johansson SA. Importance of duration of treatment with inhaled budesonide on the immediate and late bronchial reaction. *Eur J Respir Dis* 1982; 122(suppl): 167-75.
- 229.Pepys J, Davies RJ, Breslin ABX et al. The effects of inhaled beclomethasone dipropionate (Becotide) and sodium cromoglycate on asthmatic reactions to provocation test. *Clin Allergy* 1974; 4: 13-24.
- 230.Kraan J, Koeter GH, Mark TN, Sluiter HJ, De Vries K. Change in bronchial hyperreactivity induced by four weeks of treatment with antiasthmatic drugs in patients with allergic asthma; a comparison between budesonide and terbutaline. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76:628-36.
- 231.Bhagat RG, Grunstein MM. Effect of corticosteroids on bronchial responsiveness to methacholine in asthmatic children. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 902-6.
- 232.Ryan G, Latimer KM, Juniper EF, Roberts RS, Hargreave FE. Effect of beclomethasone dipropionate on bronchial responsiveness to histamine in controlled non-steroid dependent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75: 25-30.
- 233.Jenkins CR, Woolcock AJ. Effect of prednisolone and beclomethasone dipropionate on airway responsiveness in asthma; a comparative study. *Thorax* 1988; 43: 378-84.
- 234.Broder I, Barlow PP, Horton RJM. The epidemiology of asthma and hay fever in a total community. Tecumseh, Michigan. *J Allergy* 1962; 33: 524.
- 235.Stevens WJ, Vermeire PA, Van Schill LA. Bronchial hyperreactivity in rhinitis. *Eur J Respir Dis* 1983; (Suppl 128): 72-80.
- 236.Madonini E, Britiaco-Vangosa G, Papadoca A, Maccagni G, Cardani A, Saporiti F. Seasonal increase of bronchial reactivity in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79:358-63.
- 237.Braman SS, Barrows AA, DeCotiis BA, Settupane GA, Corrao WM. Airway hyperresponsiveness in allergic rhinitis. A risk factor for asthma. *Chest* 1987; 91: 671-74.
- 238.Permutt S et al. Bronchial challenge in ragweed sensitive patients. In Lichtenstein LM and Austen KF editors: *Asthma: physiology, immunopharmacology and treatment*. New York. 1977. Academic Press. Inc., p. 226.

- 239.Kaufman J and Wright GW. The effect of nasal and nasopharyngeal irritation or airway resistance in man. *Am Rev Respir Dis* 1969; 100:626.
- 240.Moloney J, Collins J. Nasal polyps and bronchial asthma. *Br J Dis Chest* 1977; 71: 1.
- 241.Henriksen JM, Wenzel A. Effect of an intranasally administered corticosteroid (budesonide) on nasal obstruction, mouth breathing asthma. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 1014-18.
- 242.Meltzer EO, Schatz M, Zeiger RS. Rinitis alérgica y no alérgica. En: Middleton E, Freed CR, Ellis EF, Adkinson NF, Yungignger JW. *Alergia. Principios y práctica*, pp: 1164-1199. Versión española de la tercera edición de la obra original en lengua inglesa. Tomo II. Salvat editores SA Barcelona 1992.
- 243.Bryan MP, Bryan WTK. Cytological diagnosis in allergic disorders. *Otolaryngol Clin North Am* 1974; 7: 637.
- 244.Elkhalil M, Fiore L, Bellioni P et al. Evaluation of nasal and blood eosinophilia in children suffering from perennial allergic rhinitis treated with beclomethasone dipropionate. *Allergol Immunopathol* 1983; 11: 225.
- 245.Meltzer EO, Orgel HA, Rogenes PR, Field EA. Nasal Cytology in patients with allergic rhinitis: effects of intranasal fluticasone propionate. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94(4):708-15.
- 246.Okuda M, Otsuka H. Basophilic cells in allergic nasal secretions. *Arch Otorhinolaryngol* 1977; 214:283.
- 247.Naclerio RM, Proud D, Togias AG et al. Inflammatory mediators in late antigen-induced rhinitis. *N Engl J Med* 1985; 313: 65.
- 248.Bascom R, Pipkorn U, Gleich G et al. Effect of systemic steroids on eosinophils and major basic protein during nasal antigen challenge (abstract). *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77: 246.
- 249.Pipkorn U, Proud C, Schleimer RP et al. Effect of systemic glucocorticoid treatment on human nasal mediator release after antigen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77(Suppl): 180.
- 250.Bascom R, Pipkorn U, Lichtenstein LM, Naclerio RM. The influx of inflammatory cells into nasal washings during the late response to antigen challenge. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 406-12.
- 251.Svensson C, Andersson M, Persson CGA, Venge P, Alkner U, Pipkorn. 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: 828-33.

252. Van Toorenbergen AW, Van Wij RG, Vermeulen AM, Zijlstra FJ. Increase albumin, eosinophil cationic protein, histamine, leukotrienes and mast cell tryptase in nasal lavage fluid after challenge with inhalant allergen extract. *Agents Actions* 1992; 36 Suppl C:C421.

253. Narita S, Saito H, Asakura K, Shirasaki H, Kataura A. Topical eosinophil responses after allergen challenge in patients with nasal allergy. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 1994; 97(6):1062-69.

254. Satoh K, Takagi I, Itoh H, Baba S. Study of eosinophil cationic protein (ECP) and arylsulfatase B in nasal secretions and sera from patients with nasal allergy. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 1991; 94(6):786-93.

255. Andersson M, Andersson P, Venge P, Pipkorn U. Eosinophils and eosinophil cationic protein in nasal lavage in allergen-induced hyperresponsiveness: effects of topical glucocorticosteroid treatment. *Allergy* 1989; 44: 342-48.

256. Bisgaard H, Gronborg H, Mygind N, Dahl R, Lindqvist 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: 891-95.

257. Wang DY, Clement P, Smitz J, De Waele M, Derde P. Quantification of eosinophil cationic protein and eosinophils in nasal secretions of allergen-induced nasal inflammation. *Allergol et Immunopathol* 1994; 22,4: 179-83.

258. Klementsson H, Andersson M, Baumgarten CR, Venge P, Pipkorn U. Changes in non-specific nasal reactivity and eosinophil influx and activation after allergen challenge. *Clin Exp Allergy* 1993; 20: 539-47.

259. Linder A, Venge P, Deuschl H. Eosinophil cationic protein and myeloperoxidase in nasal secretion as markers of inflammation in allergic rhinitis. *Allergy* 1987; 42: 583-90.

260. Klementsson H, Svensson C, Andersson M, Venge P, Pipkorn U, Persson CGA. Eosinophils, secretory responsiveness and glucocorticoid-induced effects on the nasal mucosa during a weak pollen season. *Clin Exp Allergy* 1991; 21: 705.

261. Mygind N, Dirksen A, Johnsen NJ, Weeke B. Perennial rhinitis: an analysis of skin testing, serum IgE, and blood and smear eosinophilia in 201 patients. *Clin Otolaryngol* 1978; 3: 189.

262. Beppu T, Ohta N, Gon S, Sakata K, Inamura K, Fukase S, Kimura Y, Koike Y. Eosinophil and eosinophil cationic protein in allergic rhinitis. *Acta Otolaryngol Sppl (Stockh)* 1994; 511P: 221-23.

263. Jong KC, Hsiao SH, Liu MT, Wang JS. The relationship of IgE, skin-test, eosinophilia, eosinophil cationic protein and tumor necrosis factor production in allergic rhinitis. *Chung Hua Min Kuo Sheng Wu Chi Mien I Hsueh Tsa Chih*. 1991; 24(4):345-54.

264. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. Medical Section of the American Lung Association. Am Rev Respir Dis 1987; 136: 225-43.

265. Pepys J. Skin Test in diagnosis. In: Gell PGH, Coombs RRA, Lachman PJ eds. Clinical aspects of immunology . Oxford Blackwell Scientific, 1975: 55.

266. American Thoracic Society. Standardization of spirometry. Am Rev Respir Dis 1987; 136: 1285-89.

267. Sociedad Española de Patología Respiratoria (SEPAR). Normativa para la espirometría forzada. Ed Doyma Barcelona 1985.

268. Rosenthal R. Metodología aceptada en la prueba de provocación con metacolina. Allergy Proceeding 1990; 4,2: 12-32.

269. O'Connor G, Sparrow D, Taylor D, Segal M, Weiss S. Analysis of dose-response curves to methacholine. Am Rev Respir Dis 1987; 136: 1412-17.

270. Burrows B, Sears MR, Flannery EM, Herbison GP, Holdaway MD. Relationships of bronchial responsiveness assessed by methacholine to serum IgE, lung function, symptoms, and diagnoses in 11-year-old New Zealand children. J Allergy Clin Immunol 1992; 90: 376-85.

271. Dahl R, Venge P, Olsson I. Blood eosinophil leukocytes and eosinophil cationic protein. Diurnal variation in normal subjects and patients with bronchial asthma. Scand J Respir Dis 1978; 59:232-25.

272. Venge P. Serum measurement of eosinophil cationic protein (ECP) in bronchial asthma. Clin Exp Allergy 1993; 23(Suppl 2): 3-7.

273. Ahlstedt S, Enander I, Peterson CGB, Lanner A. The clinical assesment of the inflammatory component in asthma with emphasis on the eosinophils. Pract Allergy Immunol 1993; 8:149-54.

274. Dahl R, Venge P: Blood eosinophil leucocyte and eosinophil cationic protein. In vivo study of the influence of β_2 -adrenergic drugs and steroid medication. Scand J Respir Dis 1978; 59:319-22.

275. Godard P, Chanez P, Horst V, Clauzel AM, Michel FB, Bousquet J. Evaluation of a symptom-medication score for chronic asthma. J Allergy Clin Immunol 1989; 83: 175, abstract.

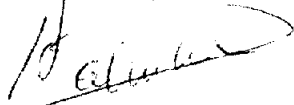
276. Zimmerman B. Eosinophil proteins as markers of inflammation in childhood asthma. Allergy Proc 1994; 15(3):143-45.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

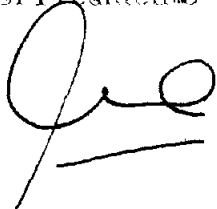
Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. FRANCISCO JAVIER ALVAREZ GUTIERREZ.
titulada MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN (PROTEÍNA
CÁRDICA DEL EDRIACILO - ECP) EN EL ASMA BRON-
QUIAL Y RINITIS ALÉRGICA
acordó otorgarle la calificación de APTO CUM LAUDE

Sevilla, 12 de DICIEMBRE 1975.

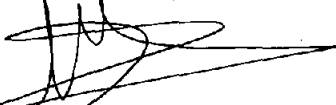
El Vocál,



El Presidente



El Vocál,



El Secretario,



El Vocál,



El Doctorado,

