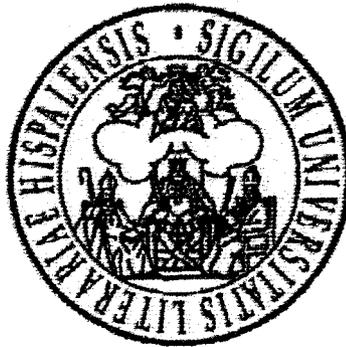


UNIVERSIDAD DE SEVILLA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
FACULTAD DE MEDICINA

T. D.
M/82.1



**Modelos Th1 y Th2 de Secreción *in vitro* de
Citoquinas en Pacientes Polínicos**

TESIS DOCTORAL

Francisco Javier Muñoz Bellido

1996

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

Grado de Medicina y Cirugía
El día 59 de Mayo de 1996 del curso 44

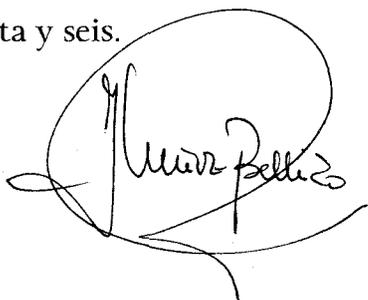
Sevilla, 59 de Mayo de 1996

El jefe del Departamento de Teoría de Teoría

F.D. P. J. M.

D. Francisco-Javier Muñoz Bellido, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado el presente trabajo titulado "Modelos Th1 y Th2 de secreción *in vitro* de citoquinas en pacientes polínicos" para optar, mediante el mismo, al grado de **Doctor en Medicina y Cirugía** por la Universidad de Sevilla.

Y, para que así conste, firmo en Sevilla a veintinueve de Mayo de mil novecientos noventa y seis.

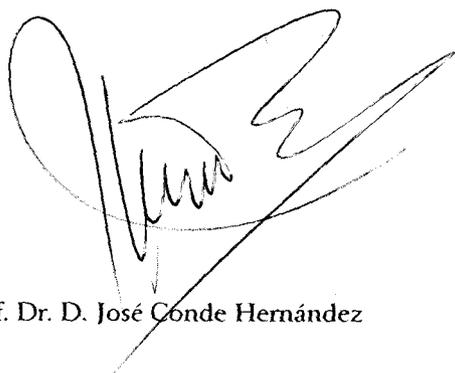


D. José Conde Hernández, Doctor en Medicina, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla y Jefe del Servicio de Alergología del Hospital Universitario *Virgen Macarena* de Sevilla, y D. Francisco-Javier Monteseirín Mateo, Doctor en Medicina,

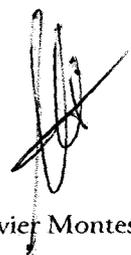
CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado "**Modelos Th1 y Th2 de secreción *in vitro* de citoquinas en pacientes polínicos**", ha sido realizado bajo su dirección por **D. Francisco-Javier Muñoz Bellido**, y reúne, a su juicio, todos y cada uno de los requisitos necesarios para poder optar, mediante él, al grado de **Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Sevilla**.

Lo que, para que así conste a los efectos oportunos, firman en Sevilla a veintinueve de Mayo de mil novecientos noventa y seis.



Prof. Dr. D. José Conde Hernández



Dr. D. Francisco-Javier Monteseirín Mateo

Dedico este trabajo a mi familia.

Mi agradecimiento a **D. José Conde Hernández** y a **D. Francisco-Javier Monteseirín Mateo**, sin cuya orientación y apoyo constante no hubiera sido posible la realización del presente trabajo, así como a todos los componentes del **Servicio de Alergología** del Hospital Universitario *Virgen Macarena* de Sevilla por su inestimable colaboración.



SUMARIO

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Mecanismos de inducción y regulación de la síntesis de IgE

in vitro.

1.1.1. Citoquinas principales.

1.1.2. Interacción entre células T y B.

1.1.3. Otros elementos que intervienen en la regulación.

1.2. Heterogeneidad de la atopia.

1.3. Supoblaciones de células T CD4+ con fenotipos de secreción opuestos (Th1, Th2).

1.3.1. Expansión de la subpoblación Th2 en pacientes con atopia.

1.3.2. Perfil de secreción en clones de células T alergenoespecíficos.

1.3.3. Mecanismos que intervienen en el desarrollo de las subpoblaciones Th1 y Th2.

1.4. Señal de transducción en la activación de las células T.

1.4.1. Estructura y función del receptor clonotípico de la célula T.

1.4.2. Rutas intracelulares de la señal de activación del TcR.

1.4.2.1. Vía de la tirosin-quinasa.

1.4.2.2. Vía de la fosfolipasa C.

1.4.3. Papel de otras moléculas en la activación de la célula T.

1.5. Activación farmacológica de los linfocitos.

1.5.1. Esteres de phorbol e ionóforos de calcio.

1.5.2. Fitohemaglutinina.

2. MOTIVO Y JUSTIFICACIÓN.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Pacientes.

3.2. Métodos.

3.2.1. Tests cutáneos.

3.2.2. Recuento de pólenes.

3.2.3. Determinación de IgE total y específica.

3.2.4. Cultivos celulares.

3.2.4.1. Procedimiento.

3.2.4.2. Diseño del ensayo.

3.2.5. Determinación de factores solubles.

3.2.5.1. Interleuquina-5.

3.2.5.2. Interleuquina-4.

3.2.5.3. Interferón- γ .

3.2.6. Tratamiento estadístico.

4. RESULTADOS

4.1. Interferón- γ .

4.2. Interleuquina-4.

4.3. Interleuquina-5.

4.4. Análisis de correlación.

5. DISCUSIÓN.

6. CONCLUSIONES.

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. INTRODUCCIÓN

La interacción entre un antígeno ambiental y el sistema inmune del individuo constituye un paso fundamental para el desarrollo de los procesos alérgicos. Esa puesta en contacto se inicia mediante la captación de los antígenos, su procesamiento y posterior presentación a células T que expresan el antígeno de superficie CD4 (CD4+) y que son específicas para ese alergeno; dicho proceso se realiza gracias a células accesorias, denominadas células presentadoras de antígenos (CPA), las cuales muestran en su superficie antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II). Posteriormente, las células T CD4+, una vez activadas, inducen la producción de inmunoglobulinas (Ig), fundamentalmente de tipo IgE, por las células B.

No obstante, aún permanece oscuro el origen de la producción preferencial de IgE en los individuos atópicos, genéticamente predispuestos al reconocimiento de determinados epítopes ⁽¹⁾.

En un primer momento, fue descrito un sistema de regulación de la síntesis de IgE en animales de laboratorio (roedores), basado esencialmente en la actividad antagónica de dos mediadores solubles, la interleuquina-4 (IL-4) y el interferón- γ (IFN- γ) ⁽²⁾.

Estudios posteriores, han aportado mayor información sobre los mecanismos que regulan esa síntesis en el ser humano, así como su alteración en los procesos alérgicos ⁽³⁻⁵⁾.

De una forma esquemática, podríamos decir que la inducción de la síntesis de la IgE viene dada por la coexistencia de dos señales:

- a)** una sería la aportada por determinadas interleuquinas, produciendo el cambio de isotipo y la consiguiente transcripción de líneas germinales ϵ en las células B.
- b)** la otra sería la señal de activación de las células B ⁽⁶⁾, que da lugar a la aparición de transcripciones maduras ϵ .

1.1. Mecanismos de inducción y regulación de la síntesis de IgE *in vitro*.

1.1.1. Citoquinas principales.

En 1986, en estudios realizados con células B de ratones, ya se puso de manifiesto la relación existente entre la actividad de la IL-4 y la síntesis de IgE (2, 7). Posteriormente, estudiando clonas de células T estimuladas con mitógenos inespecíficos, se pudo comprobar igualmente una correlación positiva entre la actividad cooperadora inductora de la síntesis de IgE y la producción de IL-4, en el ser humano. Al mismo tiempo, también se puso de manifiesto la existencia de una correlación negativa entre la producción de IFN- γ y la síntesis de IgE (8, 9).

La función contrapuesta de la IL-4 y del IFN- γ , como reguladores de la síntesis de la IgE, aparece reflejada en múltiples trabajos que estudian el comportamiento de células mononucleares de sangre periférica, tanto en individuos sanos como en pacientes atópicos o con síndrome hiper-IgE (10-12).

Dicha contraposición ha podido confirmarse al comprobar que la IL-4 humana recombinante (rIL-4) induce la síntesis de IgE, mientras que ese efecto es inhibido por la adición al medio de IFN- γ recombinante (rIFN- γ) (8).

La IL-4, además, exhibe otras actividades relacionadas con la producción de Ig^(13, 14), fundamentalmente en la síntesis de IgG, pero no ejerce efectos apreciables sobre la producción de IgA e IgM. No obstante, su papel primordial lo desempeña en la regulación de la síntesis de IgE.

La importancia de la IL-4 como inductora de la síntesis de IgE por las células B, se comprobó al observar que dicha síntesis, ya fuera espontánea o inducida por la IL-4, era inhibida por la adición al medio celular de anticuerpos monoclonales anti-IL-4⁽¹²⁾.

En ese mismo estudio, Pène *et al.*⁽¹²⁾ demostraron que, tanto el IFN- γ como el IFN- α , ejercen un efecto supresor sobre la síntesis de IgE, ya sea ésta espontánea o inducida por la IL-4, siendo dicho efecto dosis dependiente.

No obstante, se ha podido observar que el IFN- γ no suprime *in vitro* la expresión de las copias germinales e inducida por la IL-4 en células B muy purificadas, lo que nos da a entender que no ejerce su acción inhibitoria directamente sobre las células B, sino que lo haría a través de otras células presentes en el medio de cultivo⁽¹⁵⁾.

Distintos estudios realizados sobre la actividad del IFN- γ , *in vivo* e *in vitro*, muestran resultados contradictorios. Esa diversidad pudiera deberse a que las concentraciones utilizadas no fueran las idóneas, o bien a que las interacciones a las que se ve sometida la acción del IFN- γ *in vivo* son mucho

más complejas y no permiten establecer un modelo totalmente equiparable *in vitro* ⁽⁵⁾.

1.1.2. Interacción entre células T y B.

A pesar de lo expuesto anteriormente, distintos autores han puesto de manifiesto que la acción de la IL-4 *per se* no es suficiente para inducir la síntesis de IgE ^(12, 16, 17).

En ese sentido, Gauchat *et al.* ⁽¹⁵⁾, han podido verificar a nivel molecular en células humanas, que la IL-4 es capaz, por sí sola, de inducir la expresión de líneas germinales ϵ , compuestas por un exón I ϵ unido al exón CI ϵ , mediante la eliminación de las secuencias intermedias de la copia original. Sin embargo, esas copias no son efectivas, ya que el exón I ϵ contiene codones de *stop* en todas las direcciones de lectura ⁽⁶⁾.

Así pues, sin la concurrencia de otros estímulos, la IL-4 se muestra insuficiente para inducir la producción de IgE. De hecho, tanto la forma recombinante de la IL-4 como la obtenida a partir de los sobrenadantes de cultivos celulares, han sido ineficaces a la hora de producir esa inducción sobre células B muy purificadas ⁽⁸⁾.

A partir de observaciones como las citadas anteriormente, pudo comprobarse que la síntesis de IgE, en presencia de IL-4, se restauraba al añadir células T al medio ⁽¹⁸⁾; y no sólo eso, sino también que es necesaria la existencia de una interacción física entre las células T y las células B ^(16, 19). Incluso, estudiando la cinética de producción de la IgE, se ha podido determinar que esa interacción tiene lugar en un paso previo a la señal proporcionada por la IL-4 ⁽²⁰⁾. Dicha interacción física se establece a través del receptor clonotípico de la célula T (TcR) y de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad en la célula B.

De este modo, Gascan *et al.* ⁽²¹⁾, pudieron comprobar que las células B purificadas eran capaces de segregar IgE si se cultivaban en presencia de IL-4 y de membranas celulares de linfocitos T CD4+ activados.

En ese mismo sentido, otros autores han descrito proteínas de membrana de las células T capaces, en presencia de IL-4, de inducir en los linfocitos B el cambio de isotipo hacia la IgE ⁽²²⁾.

1.1.3. Otros elementos que intervienen en la regulación.

Todo lo expuesto anteriormente nos induce a pensar que la regulación de la síntesis de IgE, aunque compleja, está basada en dos pilares fundamentales ⁽³⁾:

- a) la interacción entre las células B y las células T CD4+ con actividad cooperadora.
- b) la señal proporcionada por la IL-4 liberada al medio, fundamentalmente por las células T CD4+.

Sin embargo, algunos autores discrepan, al menos en parte, de esas conclusiones. Así, por ejemplo, existen trabajos ⁽²³⁾ en los que no se observan diferencias significativas en la secreción de IL-2, IL-4 e IFN- γ entre pacientes atópicos e individuos sanos, tras su estimulación, y tampoco demuestra una correlación positiva entre los niveles de IgE y los de IL-4 en los individuos atópicos; sin embargo, sí se aprecia una correlación positiva en los sujetos no atópicos. A la vista de esos resultados, los mismos autores sugieren que la producción de IgE en sujetos atópicos no dependería en tanto grado de la actividad de la IL-4, sino que también jugaría un papel importante la acción de otras citoquinas ⁽²³⁾.

De hecho, posteriormente, se ha demostrado que la IL-13, sin la participación de la IL-4, es capaz de inducir la síntesis de IgG₄ e IgE, así como de favorecer la expresión de moléculas del MHC-II y de CD23 ⁽²⁴⁾, con un mecanismo de acción similar al de la IL-4. No en vano, en cuanto a su estructura molecular, la IL-13 conserva cierta homología con la IL-4 en los

residuos que proporcionan su estructura hidrofóbica, e incluso los receptores de ambas interleuquinas, aunque diferentes, comparten un componente común que participa en la señal de transducción de ambas señales ⁽²⁵⁻²⁷⁾.

Igualmente, ha sido descrita otra vía para la inducción de la síntesis de IgE e IgG₄; dicha vía se basa, tanto en la actuación de la IL-4, como en la activación de las células B a través de su antígeno de superficie CD40 ⁽²⁸⁾. Ese antígeno de superficie CD40 es una glicoproteína que se encuentra en todas las células B. Su ligando natural, expresado en las células T activadas, es otra glicoproteína que presenta cierta homología con los factores de necrosis tumoral (TNF) α y β ⁽²⁹⁾.

Con respecto a su fisiología, es interesante destacar que la síntesis de IgE inducida por esta vía no se inhibe por IFN- γ , ni por anticuerpos anti-IL-6 o anti-CD23, aunque sí lo es por anticuerpos anti-IL-4 ⁽³⁰⁾. Por lo tanto, depende para su funcionamiento de la acción de la IL-4.

También se ha comprobado que la estimulación del antígeno de superficie CD58 (LFA-3), presente en los linfocitos B, en presencia de IL-4, induce la producción de IgE, actuando por una vía independiente a la del CD40 ⁽³¹⁾.

A nivel genético, las vías de activación mencionadas necesitan la acción previa de la IL-4 sobre las células B para inducir la síntesis de copias germinales C_{ϵ} , de forma que la estimulación posterior del CD40 o del CD58 puedan dar lugar al cambio del isotipo y la síntesis de mRNA $_{\epsilon}$ maduro, que conduce finalmente a la síntesis de IgE ^(31, 32).

Por otra parte, también ha podido comprobarse que la fracción soluble del receptor de baja afinidad para la IgE (sCD23) interviene en la regulación de la síntesis de IgE, y esta acción la llevaría a cabo de forma sinérgica con la IL-4 ^(10, 12, 33). De hecho, la expresión de CD23 y, por lo tanto, los niveles de sCD23, son inducidos por la IL-4. Como en otras ocasiones, esa acción de la IL-4 sobre las células B puede ser bloqueada por el IFN- γ .

La función desempeñada por el CD23, posiblemente, sea como molécula co-estimuladora y/o de adhesión, tanto entre células B y T como entre las células B entre sí ⁽³⁴⁾. Por lo tanto, aunque el CD23 puede intervenir también en los mecanismos de regulación de la síntesis de IgE, su acción sería secundaria a las desarrolladas por la IL-4 y el IFN- γ .

Otra molécula que, al menos de forma indirecta, puede intervenir en los mecanismos de regulación de la síntesis de IgE, es el antígeno de superficie

CD28, ya que la unión a su ligando natural (B7) proporciona una potente señal complementaria en la estimulación de la célula T CD4+. No obstante, el papel primordial en este aspecto lo desempeña la IL-2 ^(35,36).

La estimulación de la célula T CD4+, induciría la producción de IL-2, IL-6, IFN- γ , factor estimulante de las colonias de granulocitos y monocitos (CSF-GM) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interviniendo también en la producción de otras citoquinas, como son IL-4, IL-5 e IL-10. Sin embargo, parece ser que esa producción estaría restringida a las células de memoria (CD45RO+) y también puede inhibirse por la adición al medio de IFN- γ ⁽³⁵⁾.

Otras interleuquinas que intervienen en la modulación de la síntesis de IgE son la IL-5 y la IL-6, capaces de incrementar la síntesis de la IgE inducida por la IL-4, si bien, por sí solas, son incapaces de inducirla ^(37,38).

Con una acción antagónica a las anteriores aparece la IL-10, la cual es capaz de inhibir la secreción de IgE e IgG₄ inducida por la IL-4 en células B humanas, aunque posiblemente este efecto lo ejerza inhibiendo la función accesoria de los monocitos ⁽³⁹⁾.

Otras moléculas que al parecer también pueden ejercer una actividad inhibitoria, dentro de los mecanismos de regulación de la síntesis de IgE, serían la IL-8 y la IL-12, así como del antígeno de superficie CD14 ⁽⁵⁾.



Finalmente, hemos de reseñar que se han descrito otras vías para la secreción de IgE, independientes de los linfocitos T. En este sentido, existen trabajos en los que se ha mostrado cómo los basófilos son capaces de segregar IL-4⁽⁴⁰⁾.

También los mastocitos activados a través de receptores de superficie para la IgE, presentan capacidad para segregar citoquinas con un patrón semejante al de las células Th2⁽⁴¹⁾. Incluso, ha podido ponerse de manifiesto en mastocitos humanos que, además de mostrar heterogeneidad con respecto al contenido enzimático de sus gránulos, también son heterogéneos con respecto al contenido de citoquinas. Dicha heterogeneidad, puede indicar que la función desempeñada por cada subclase de mastocitos vendría determinada o estaría relacionada con su capacidad para generar y liberar diferentes perfiles de citoquinas⁽⁴²⁾.

Por último, algunos autores han descrito la participación de factores neuroendocrinos⁽⁴³⁾, así como de auto-anticuerpos^(44,45), en los mecanismos de regulación de la síntesis de IgE, sugiriendo nuevos conceptos en el sistema inmunológico que aún no están totalmente contrastados.

1.2. Heterogeneidad de la atopía.

Debemos tener presente en todo momento que la atopía es una condición heterogénea. La primera evidencia que nos indica que la expresión clínica de la atopía depende de múltiples factores fue dada por Coca *et al.* ⁽⁴⁶⁾.

Actualmente, es bien sabido que la respuesta del sistema inmune frente a los antígenos extraños depende tanto de factores genéticos como de factores ambientales. De este modo, los individuos atópicos, sometidos a una predisposición genética, al ser expuestos a un ambiente normal ponen en marcha una respuesta mediada fundamentalmente por IgE, siendo esta respuesta variable en intensidad de unos individuos a otros. En ese mismo sentido, también es habitual ver cómo distintos individuos atópicos, sometidos a un mismo ambiente, pueden manifestar iguales o diferentes síntomas de alergia.

Así pues, podemos decir que la heterogeneidad de los procesos alérgicos afectará a sus manifestaciones clínicas, pero, al mismo tiempo, puede verse reflejada y confirmada en estudios genéticos e inmunológicos.

Desde el punto de vista inmunológico, la heterogeneidad de la atopia se pone de manifiesto en la variable capacidad de producción de citoquinas por parte de los linfocitos ⁽⁴⁷⁾. Como hemos mencionado anteriormente, es bien sabido que éstas juegan un papel crucial en la regulación de la síntesis de la IgE.

Diversos autores han llegado a la conclusión de que la respuesta mediada por IgE en pacientes sensibilizados frente a un único alérgeno es menos potente que la observada en sujetos polisensibilizados ⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾. Concretamente, en esos estudios pudo comprobarse que los niveles séricos de IgE en sujetos no atópicos son menores que en los atópicos sensibles a un único alérgeno y, a su vez, menor en éstos que en los individuos atópicos polisensibilizados.

En ese mismo sentido, al estudiar el comportamiento de las células T, se puso de manifiesto que éstas presentan una mayor capacidad de producción de IL-4 en pacientes atópicos polisensibilizados que en los monosensibles y, a su vez, mayor en éstos que en los sujetos no atópicos. Por el contrario, son los individuos no atópicos los que exhiben niveles superiores de secreción de IFN- γ , sin que se observen diferencias significativas a este respecto entre los sujetos atópicos monosensibilizados y los polisensibilizados ^(49, 50).

Abundando en el reflejo a nivel inmunológico de la heterogeneidad de la atopia, también se ha llegado a la conclusión de que la capacidad de las células de memoria CD45RO+ para derivar hacia un perfil de secreción de citoquinas de tipo colaborador / inductor (Th2) no es constante. De hecho, la cantidad de IL-4 producida por las células T CD4+ alérgeno-específicas puede verse reducida considerablemente tras tratamiento *in vivo* con el alérgeno sensibilizante (inmunoterapia específica), llegando a ser comparable a la respuesta inducida en sujetos no atópicos o, al menos, a la inducida por otros antígenos inespecíficos no alérgicos ⁽⁵⁰⁾.

Otros autores llegan a conclusiones parecidas atendiendo a las manifestaciones clínicas de la enfermedad atópica. En este sentido, comprueban que la inmunoterapia se muestra más efectiva, tanto en la mejoría de los síntomas como en la reducción de la necesidad de medicación sintomática, en los sujetos monosensibilizados que en los sensibles a varios alérgenos ⁽⁵¹⁾.

A la vista de esos hechos, podemos deducir la existencia de cierta correlación entre la heterogeneidad clínica de la atopia y una posible alteración de la secreción de las citoquinas involucradas en la regulación de la síntesis de la IgE, al menos *in vitro*, en los individuos atópicos.

Algunos autores justifican dicha heterogeneidad en la respuesta mediada por IgE, sugiriendo la existencia de individuos *altos respondedores* e individuos *bajos respondedores*, respecto a la acción de la IL-4 ⁽⁵²⁾.

Bousquet *et al.* ⁽⁵³⁾, en esa misma línea de pensamiento, piensan que dicha diferenciación se justificaría por la existencia de una alteración en la unión de las moléculas del MHC de clase II en los *altos respondedores*. Es decir, los antígenos del MHC de clase II también podrían unirse, en los individuos *altos respondedores*, a algunos péptidos derivados de los alérgenos específicos responsables, si bien lo harían con menor especificidad. Por el contrario, los *bajos respondedores*, que no tendrían esa capacidad, desarrollarían la respuesta frente a una gama menos amplia de péptidos alérgicos.

Otros autores han demostrado que los individuos sensibilizados a múltiples alérgenos desarrollan síntomas nasales y bronquiales de forma más precoz que los sujetos monosensibilizados, durante el periodo de exposición alérgica ⁽⁵⁴⁾. Este hecho vendría determinado por el efecto facilitador que la exposición inicial ejercería sobre las siguientes (efecto *priming*). Sin embargo, este mismo trabajo, no demuestra una correlación significativa entre la severidad de los síntomas y el grado de sensibilización de cada individuo.

1.3. Subpoblaciones de células T CD4+ con fenotipos de secreción opuestos (Th1, Th2).

Para estudiar la naturaleza de las distintas subpoblaciones de células T CD4+, algunos autores han observado su comportamiento frente a diferentes clases de antígenos (alergenos, antígenos de helmintos y antígenos bacterianos) ⁽⁵⁵⁾.

De este modo, han podido comprobar que los antígenos bacterianos inducen preferentemente la aparición de clones de células T productoras de IFN- γ e IL-2, pero que, por el contrario, no manifiestan capacidad para producir IL-4 e IL-5 (perfil de secreción que se ha denominado Th1). Sin embargo, los antígenos de helmintos y los alergenos inducen la proliferación de clones de células T secretoras de IL-4 e IL-5 preferentemente, pero no de IL-2 e IFN- γ (perfil de secreción conocido como Th2). En ese mismo sentido, también se ha podido determinar que cada subpoblación de las anteriormente citadas es defectiva para la transcripción del mRNA de las linfoquinas que no segrega ^(55, 61). Así pues, podemos decir que esta capacidad de cada clon de células vendría determinada de forma genética.

Los clones celulares con fenotipos Th1 y Th2 también difieren en otros aspectos, como son su capacidad citolítica y su forma de colaborar en la síntesis de Ig por las células B.

Respecto a la primera de esas funciones, es bien sabido que la mayoría de las células Th1 y, en cambio, pocas Th2 exhiben actividad citotóxica.

En cuanto a la síntesis de Ig, las células Th2 no citolíticas son capaces de inducir la secreción de los isotipos IgM, IgA, IgG e IgE por células B autólogas en presencia de antígenos específicos. Por el contrario, las Th1 pueden mostrar actividad cooperadora para la secreción de IgM, IgA e IgG, pero no de IgE.

La actividad cooperadora de las células Th2 en la síntesis de Ig, se ha comprobado que es proporcional al número de dichas células presentes en el medio. Por su parte, las células Th1 exhiben su pico máximo de actividad cuando existe una proporción aproximada de 1:1 con las células B, disminuyendo claramente la síntesis de Ig si se aumenta esa proporción. Esta distinta cinética en su actividad podría determinar la capacidad lítica de las células Th1, y podría ser un importante mecanismo de inhibición de la síntesis de Ig, *in vivo* ⁽⁵⁶⁾.

1.3.1. Expansión de la subpoblación Th2 en pacientes con atopia.

Algunos autores, estudiando el comportamiento de clones de células T procedentes de individuos con síndrome hiper-IgE, tras su estimulación con un mitógeno (PHA), refieren la presencia de una proporción significativamente menor de células productoras de IFN- γ y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), en comparación con un grupo control de sujetos sanos; sin embargo, no observan diferencias en lo que respecta a las células productoras de IL-2 ó IL-4 ⁽⁵⁷⁾.

Esto nos sugiere que el descenso en la secreción de IFN- γ estaría relacionado con el exceso de producción de IgE, al menos en pacientes con el citado síndrome hiper-IgE.

Como es sabido, los pacientes atópicos pueden presentar eosinofilia y niveles altos de IgE en el suero. Considerando el importante papel que desempeña la IL-5 en el proceso de diferenciación de los eosinófilos, Sanderson *et al.* ⁽⁵⁸⁾, ya sugirieron en 1983 la posibilidad de diferenciar en el hombre subpoblaciones de células T CD4+ en función de su capacidad para la secreción de determinadas citoquinas, semejantes a las subpoblaciones

observadas en los ratones. De esta forma, las denominadas células Th2 serían las encargadas de la producción de IL-4 e IL-5, pero no producirían IFN- γ ⁽⁵⁹⁾.

Otros autores, estudiando el comportamiento *in vitro* de células T de pacientes atópicos, tras ser estimuladas con PHA, han constatado un incremento en la producción de IL-4 y un descenso en la de IFN- γ , en comparación con sujetos sanos ^(3, 60).

Igualmente, en clones de células T derivadas de infiltrados conjuntivales de pacientes atópicos, ha podido observarse que la mayoría de dichos clones están formados por células CD4+ productoras de IL-4 e inductoras de la síntesis de IgE; por el contrario, pocas células presentaban capacidad de secreción de IFN- γ , ni se detectaba en su citoplasma la presencia de mRNA que codificase la síntesis de IFN- γ ⁽⁶¹⁾.

Otros trabajos, centrados en el estudio de biopsias bronquiales obtenidas de pacientes con asma alérgica, han demostrado que las células T, obtenidas a partir de dichas muestras, mostraban una pobre respuesta en cuanto a la producción de IL-2 e IFN- γ . No obstante, presentaban una importante respuesta atendiendo a su producción de IL-5 ⁽⁶²⁾. Como es sabido, tanto la IL-5 como la IL-6 también intervienen en la respuesta IgE incrementando el efecto de la IL-4 ^(63, 64).

La IL-5 potencia la producción de IgE inducida por IL-4, pero sólo en algunos individuos potencia la secreción espontánea de IgE, sugiriendo la presencia de pequeñas cantidades de IgE endógena en estos últimos ⁽¹¹⁾.

Así pues, numerosos trabajos sugieren que la producción incrementada de IgE y la eosinofilia que frecuentemente se observan en individuos atópicos, seguramente estén causadas por la expansión preferente de clones celulares con fenotipoTh2 o por su acumulación en los órganos diana. Por lo tanto, podríamos decir que el nivel de IgE *in vivo* dependería directamente del balance existente en cada momento entre las células Th1 y las Th2 de cada individuo.

1.3.2. Perfil de secreción en clones de células T alergenoespecíficos.

Algunos autores han comparado en sus estudios la respuesta de clones de células T específicos para un determinado alergeno, con la de otros clones específicos para otros antígenos, como el toxoide tetánico o el PPD (derivado proteico purificado de *Mycobacterium tuberculosis*).

Parronchi *et al.* ⁽⁶⁵⁾, observaron que prácticamente todos los clones alergeno-específicos muestran un perfil de secreción Th2, en respuesta a su

estimulación con un mitógeno (PHA) más anticuerpos monoclonales anti-CD3; sin embargo, frente a toxoide tetánico muestran un patrón intermedio (producen IL-4 e IFN- γ), y frente a PPD se comportan siguiendo el patrón Th1.

Surcel *et al.* ⁽⁶⁶⁾, por su parte, tras comprobar que el fenotipo Th2 es el predominante en la respuesta inmune frente a los antígenos principales micobacterianos, sugieren que esa diferenciación podría jugar algún papel en la resistencia o susceptibilidad a la infección por tales microorganismos.

Wierenga *et al.* ⁽⁶⁷⁾, difieren algo de los anteriores pero concuerdan en afirmar que, en individuos genéticamente predispuestos para reconocer un epítotope determinado, la respuesta inmune frente a antígenos ambientales desemboca en una activación preferente de células T con patrón de secreción de linfoquinas de tipo Th2; de esa forma, la IL-4 y la IL-5 serían responsables, respectivamente, de la inducción de la síntesis de IgE y del aumento de eosinófilos observados en estos individuos. Estos datos concuerdan con los hallados por otros autores en pacientes que presentaban enfermedad atópica leve ⁽⁶³⁾.

Por otra parte, los clones de células T específicas para antígenos bacterianos presentan mayor capacidad para producir IL-4 en sujetos atópicos que en el resto ⁽⁶⁴⁾. Esto sugiere que, en individuos atópicos, existe una mayor

capacidad para producir IL-4, no sólo como respuesta a alérgenos ambientales o antígenos de helmintos, sino también frente a otros antígenos diferentes ⁽⁶⁸⁾.

A pesar de todo, las alteraciones moleculares responsables de esa mayor capacidad de los individuos atópicos para desarrollar una respuesta de tipo Th2 frente a distintos tipos de antígenos son, hasta el momento, desconocidas.

1.3.3. Mecanismos que intervienen en el desarrollo de las subpoblaciones Th1 y Th2.

La presencia o ausencia de determinadas citoquinas en los cultivos de células mononucleares de sangre periférica, antes de su clonación, juega un importante papel regulador en la diferenciación de los clones de células T CD4+ en subpoblaciones Th1 o Th2.

Las líneas celulares obtenidas mediante el cultivo de células mononucleares de sangre periférica y su estimulación con un alérgeno específico junto con IL-2, muestran un patrón de secreción de tipo Th2; pero éste comportamiento se inhibe tras la adición al medio de IFN- γ y/o anticuerpos anti-IL-4 ⁽⁶⁹⁾.

La presencia de IL-2 parece ser necesaria para que las células T CD4+ vírgenes se diferencien hacia los fenotipos Th1 o Th2, pero no constituye un

factor determinante en ese proceso. Sólo si la IL-4 está presente en el inicio de la estimulación antigénica, las células CD4+ se diferenciarán hacia células Th2; en su ausencia, lo harán hacia células productoras de IFN- γ (Th1) ⁽⁷⁰⁾.

Por otra parte, también se ha observado que la IL-12 actúa facilitando el desarrollo de una respuesta de tipo Th1, con gran producción de IFN- γ , inhibiendo, al mismo tiempo, la diferenciación hacia células productoras de IL-4. Por lo tanto, la IL-12 induciría la diferenciación de las clonas hacia el fenotipo Th1 ^(70, 71).

Aunque otros factores tales como la dosis de antígeno, el tipo de célula presentadora del antígeno, la expresión de moléculas accesorias o la presencia de hormonas en el medio pueden jugar algún papel en la diferenciación hacia uno u otro fenotipo de secreción, todos ellos parecen ser secundarios frente al papel preponderante de las linfoquinas y otras citoquinas en esos mecanismos de regulación.

1.4. Señal de transducción en la activación de las células T.

Los linfocitos T se comunican con su entorno a través de un amplio repertorio de receptores situados en su superficie. La estimulación de dichos receptores da lugar a la producción de señales que desempeñan diversos papeles en la ontogenia de las células T, en la activación de las células por los antígenos y en otros muchos aspectos de la biología celular.

Múltiples estudios llevados a cabo en este campo durante los últimos años, han proporcionado gran cantidad de información acerca de los mecanismos por los que estos receptores de superficie influyen sobre los acontecimientos bioquímicos intracelulares.

La señal transmembrana se inicia a raíz de la unión entre la porción extracelular del receptor de superficie y su ligando específico. Parece ser que la señal producida es transmitida a través de la membrana plasmática, bien mediante un cambio conformacional del receptor ⁽⁷²⁾, o bien por una variación en su asociación a otras proteínas celulares ⁽⁷³⁾. De una u otra forma, esos cambios producidos en el receptor inducen, a su vez, variaciones en la concentración y en la actividad de importantes proteínas reguladoras y de

otras moléculas con capacidad para actuar como *segundo mensajero*. Posteriormente, la señal de activación llega hasta en núcleo celular, y allí ejerce su acción sobre los mecanismos reguladores de la transcripción.

Finalmente, todo este proceso conduce a la expresión o no de determinados genes, dando lugar a la aparición de marcadores fenotípicos y funcionales que estarían asociados a la estimulación del receptor.

Las células T, a lo largo de su desarrollo ontogénico, difieren en su capacidad de respuesta a la estimulación del receptor clonotípico para el antígeno (TcR). De hecho, sólo las células más maduras son capaces de incrementar su concentración intracelular de Ca^{2+} en respuesta a esa estimulación ⁽⁷⁴⁾.

Por otra parte, en varios estudios ha podido observarse cómo diferentes clones y subpoblaciones de las células T responden de formas distintas tras la estimulación del TcR. Según esto, distintos clones celulares pueden diferir, *in vitro*, en el segundo mensajero que es activado tras la estimulación del TcR ^{(75,}

76)

Otros trabajos más recientes también han demostrado que, a pesar de tener semejante concentración de TcR en su superficie, las células T vírgenes difieren de las células memoria en su capacidad para proliferar y segregar

citoquinas como respuesta a su estimulación, ya sea ésta a través del receptor o del antígeno de superficie CD2^(77, 78).

El estudio detallado de la señal de transducción ha puesto de manifiesto que ésta involucra, además, a otros marcadores que contribuyen de forma importante al resultado final. De esta forma, entre otros, se incluyen los antígenos de superficie CD4, CD8 y CD45, así como las moléculas de adhesión. Sin embargo, el papel de cada uno de ellos no será comprendido completamente hasta que no conozcamos tanto las señales a las que dan lugar, como la forma en que éstas interactúan con las generadas por el TcR⁽⁷⁹⁾.

1.4.1. Estructura y función del TcR.

El receptor para el antígeno de la célula T es un complejo formado por múltiples cadenas glicoproteicas, capaz de reconocer el antígeno cuando éste le es presentado en compañía de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad^(80, 81).

En la estructura del receptor se distinguen tres partes fundamentales:

- a) un heterodímero clonotípico T_i, formado por dos cadenas (α y β), el cual se une de forma específica al antígeno.

- b)* el antígeno de superficie CD3, formado por tres cadenas (γ , δ y ϵ).
- c)* la cadena ζ o miembros de su familia de proteínas (la cadena η y la subunidad γ del receptor para la IgE), que forman dímeros unidos por puentes disulfuro ⁽⁸²⁻⁸⁴⁾.

Las cadenas α y β muestran una porción larga extracelular, que se une de forma específica al antígeno en presencia de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, y otra porción más corta, intracelular, que probablemente no intervenga en la señal de transducción.

Por el contrario, el resto de las cadenas polipeptídicas (CD3 y familia ζ) presentan dominios extracelulares relativamente cortos y dominios intracelulares más largos, los cuales sí intervienen en la señal de transducción.

En diversos estudios, ha podido demostrarse una amplia variabilidad en la composición del TcR. Así, en la porción Ti encontramos de forma predominante las cadenas α y β , pero también pueden encontrarse otras cadenas (γ y δ) en una apreciable proporción de células T ^(85, 86).

Del mismo modo, la composición del CD3 es compleja; la cadena ϵ se asocia, bien con la cadena δ , o bien con la γ , existiendo dos cadenas ϵ por cada receptor ^(87, 88).

Finalmente, también las cadenas de la familia ζ presentan una composición variable; lo más habitual es la presencia de un homodímero ζ - ζ unido por puentes disulfuro, pero también se han encontrado dímeros ζ - η ⁽⁶⁷⁾.

Una vez conocida la composición del TcR, otros trabajos han intentado determinar cuál o cuales de estas cadenas intervienen de forma directa en la señal de transducción a través de la membrana citoplásmica.

Los estudios realizados parecen demostrar que, tanto la porción intracelular de la cadena ζ como la de la cadena ϵ del CD3, son capaces de generar la señal transmembrana, independientemente de las otras cadenas polipeptídicas que forman el TcR ⁽⁸⁹⁻⁹¹⁾.

1.4.2. Rutas intracelulares de la señal de activación del TcR.

La unión entre el antígeno y el TcR da lugar a la activación de dos vías intracelulares de transducción de la señal ⁽⁹²⁻⁹⁵⁾.

Por una parte, se activa una tirosin-quinasa encargada de fosforilar la cadena ζ del TcR y otros substratos celulares. Por otra, la fosfolipasa-C (PLC) incrementa el recambio de fosfatidil-inositol-bifosfato (PIP2), dando lugar a un aumento de diacilglicerol (DAG) y de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) ⁽⁹⁶⁾.



El IP3 actúa incrementando la concentración de calcio intracelular, mientras que el DAG activa la protein-quinasa C (PKC). Igual que la tirosin-quinasa, la PKC puede fosforilar algunos componentes del TcR, que en este caso serían las cadenas γ y ϵ del CD3 y otros substratos celulares.

La existencia de dos vías de activación en seguida nos plantea la posibilidad de que existan conexiones entre ellas. Distintos autores han mostrado evidencias que sugieren la existencia de una interrelación entre dichas vías de activación ^(74, 97, 98). Esos trabajos nos indican que la activación de la tirosin-quinasa es un paso necesario para la activación a través del TcR, mientras que la activación de la PLC sería posterior.

1.4.2.1. Vía de la tirosin-quinasa:

La fosforilación de la tirosina tras la estimulación del TcR se comprende mejor si se concibe como el resultado de la acción de dos sistemas enzimáticos opuestos. De esta forma, el nivel de fosforilación de la tirosina de las proteínas celulares depende, por un lado, de la acción de las tirosin-quinatas y, por otro, de la desfosforilación llevada a cabo por las tirosin-fosfatasas ⁽⁹⁹⁾. Ambos procesos, por tanto, son importantes en la regulación de la fosforilación de la tirosina en los linfocitos T.



Parece ser que entre las tirosin-quinasa celulares, las que se encuentran directamente envueltas en la señal de activación del TcR son la p56^{l_kc} y la p59^{l_m}.

La tirosin-quinasa p56^{l_kc} está presente en las células T y aparece asociada en gran manera a los antígenos de superficie CD4 y CD8 ⁽¹⁰⁰⁻¹⁰³⁾. Estos marcadores de superficie entrarían en contacto con el TcR al unirse ambos a través del complejo formado por el antígeno y las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad.

Abraham *et al.* ⁽¹⁰⁴⁾, demostraron también el sinergismo existente entre la actividad de la tirosin-quinasa p56^{l_kc} y la presencia del TcR, tanto en su capacidad de fosforilación como en la posterior producción de IL-2.

Samelson *et al.* ⁽¹⁰⁵⁾, por su parte, descubrieron la existencia de la otra tirosin-quinasa, la p59^{l_m}, asociada directamente al TcR. Posteriormente, se ha demostrado que ésta también interviene en la transducción de la señal de activación transmembrana ⁽¹⁰⁶⁾.

No obstante, los avances en este campo son continuos. De hecho, ha sido descrita una nueva actividad tirosin-quinasa asociada al TcR, concretamente en células estimuladas y ligada a la cadena ζ del TcR ⁽¹⁰⁷⁾, aunque su papel en la señal de transducción no está aún bien determinado.

En cuanto a las tirosin-fosfatasa, su papel en la señal mediada por el TcR comenzó a ser tenido en cuenta al comprobarse que la glicoproteína de superficie CD45 tenía actividad tirosin-fosfatasa. Posteriormente, se ha visto que ésta forma parte de una amplia familia de tirosin-fosfatasa citoplasmáticas y transmembrana, varias de las cuales se pueden encontrar en las células T ⁽¹⁰⁸⁾.

El papel desempeñado por estas enzimas, posiblemente tenga efecto en las fases más precoces de la transducción de la señal, quizás regulando la activación de las tirosin-quinasa ⁽³⁷⁾.

Para comprender el papel de la tirosin-quinasa es fundamental conocer los substratos sobre los cuales actúa tras su activación. Uno de los más importantes es la fosfolipasa C ⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾. Concretamente su isoforma γ (PLC γ), tras la estimulación del TCR, es fosforilada por la tirosin-quinasa y, de esta forma, activada ⁽¹¹²⁻¹¹⁴⁾.

Esto fundamenta la hipótesis de que la activación de la tirosin-quinasa es más precoz y, a su vez, necesaria para la puesta en marcha de la vía de la PLC en la transducción de la señal.

1.4.2.2. Vía de la fosfolipasa C:

La activación de la PLC es un acontecimiento precoz tras la estimulación del TcR, y como hemos dicho antes, conduce a la hidrólisis del fosfatidil-inositol-bifosfato (PIP₂), dando lugar a la formación de diacilglicerol (DAG) más inositol-trifosfato (IP₃).

El IP₃ es un mediador hidrofílico citoplásmico que se une a receptores específicos localizados en el retículo endoplásmico, dando lugar a la apertura de canales que liberan hacia el citoplasma el Ca²⁺ almacenado.

Por su parte, el DAG, en presencia de Ca²⁺, se une a la PKC y la activa. Los acontecimientos que siguen a la activación de la PKC no están aún bien establecidos, entre otras cosas porque se han definido con certeza pocos substratos sobre los que actúa. A esto, se suma una mayor complejidad, si tenemos en cuenta que se han descrito varias isoformas de la PKC ⁽¹¹⁵⁾, que se activan de forma diferente y tienen distintas localizaciones dentro de la célula ⁽¹¹⁶⁾.

Una acción bien conocida de la PKC es la fosforilación de las cadenas γ y ϵ de la molécula CD3 ⁽¹¹⁷⁾, pero las consecuencias de esta fosforilación permanecen aún inciertas. A este respecto, algunos autores han sugerido la posibilidad de que la activación de la PKC por la PLC pueda inducir la expresión de determinados genes, entre ellos los que codifican la IL-2 ⁽¹¹⁸⁾.

Corroborando esta hipótesis existen estudios demostrando que la activación farmacológica de la PKC, mediante ésteres de phorbol, en combinación con ionóforos de calcio, constituye un estímulo suficiente para la producción de IL-2 ⁽⁷⁸⁾.

En ese mismo sentido, otros autores han comprobado que la activación de la vía de la PLC también da lugar a la producción de IL-2, sin que intervengan las tirosin-quinasa ⁽¹¹⁹⁾.

Igualmente, parece ser que la vía de la tirosin-quinasa, también induce la producción de IL-2 sin que se vea implicada la activación de la PKC ^(120, 121).

Así pues, aunque las dos principales vías de activación (tirosin-quinasa y PLC) puedan presentar interconexiones, parece ser que son independientes para su funcionamiento.

1.4.3. Papel de otras moléculas en la activación de la célula T.

Las células T no proliferan en respuesta a la estimulación antigénica del TcR, a menos que se produzcan otras señales procedentes de las células presentadoras de antígenos (CPA) ⁽¹²²⁾.

En la mayor parte de los casos, esa señal adicional requiere el contacto físico entre las células, mientras que, en otros casos, es proporcionada por mediadores solubles. De este modo, las células T CD4+ necesitan la

interacción entre sus moléculas de adhesión y las correspondientes de las CPA para producir esa señal adicional (por ejemplo, CD28, CTLA-4 y B7) ^(123, 124).

Un aspecto importante de la acción de estas moléculas accesorias, es establecer si su efecto es independiente de la señal del TcR, o bien ejercen su función reforzando dicha señal. A este respecto, parece ser que la acción del marcador de superficie CD28 es independiente del TcR, dado que induce la secreción de linfoquinas por diferentes mecanismos ^(125, 126), incluso en presencia de una estimulación máxima por ésteres de phorbol más ionóforo de calcio ⁽¹²⁷⁾, y ese efecto no se inhibe por la adición de ciclosporina A.

Otras moléculas implicadas en las señales de activación, o que se sospecha su intervención en ellas, son CD2, CD4, CD8, CD5, LFA-1, CD69 y las integrinas VLA-4, VLA-5 y VLA-6 ⁽³⁷⁾.

También se ha estudiado la intervención de distintas citoquinas en la señal de activación celular o, más concretamente, de los receptores de tales citoquinas. Parece ser que ninguno de estos receptores posee por sí mismo actividad enzimática, por lo que se cree que están unidos de alguna forma a las otras vías de transducción de la señal ⁽¹²⁸⁻¹³⁰⁾.

1.5. Activación farmacológica de los linfocitos.

A lo largo de los múltiples trabajos llevados a cabo para el estudio *in vitro* de la activación de los linfocitos, se han utilizado diferentes modelos experimentales. En ellos a menudo se recurre a la activación farmacológica inespecífica de los linfocitos mediante diferentes sustancias y a distintas concentraciones, intentando mantener en lo posible un grado de estimulación controlado y uniforme que permita extraer conclusiones más firmes. Entre esas sustancias, algunas de las más utilizadas son los ésteres de phorbol junto con ionóforos de calcio, y la fitohemaglutinina.

1.5.1. Ésteres de phorbol e ionóforos de calcio.

La activación de las células B puede ser simulada farmacológicamente mediante la adición al medio de ionóforos de Ca^{2+} , unida a la activación de la PKC por ésteres de phorbol ^(131, 132); ambos estímulos son suficientes para evocar una respuesta proliferativa ⁽¹³³⁾.

Los ésteres de phorbol han sido utilizados ampliamente como activadores de la PKC de forma independiente respecto a los agonistas de los receptores ⁽¹³⁴⁾. Esta familia de sustancias agrupa una serie de moléculas

derivadas de las plantas, que están químicamente relacionadas y tienen actividades biológicas similares.

Entre ellos, uno de los más usados en estudios de activación de la PKC es el phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA). Esta molécula exhibe un amplio espectro de efectos biológicos incluyendo la aparición de neoplasias, el desarrollo de una respuesta inflamatoria, la mitogénesis de las células T y la agregación plaquetaria, entre otras ⁽¹³⁵⁾. Otros ésteres de la misma familia, que también activan la PKC, tienen un rango de actividades biológicas más limitado ^(135, 136).

Hasta el momento, se han descrito varias isoformas de la PKC ^(135, 137). Los isotipos α , β_1 , β_2 y γ requieren calcio y fosfatidil-serina para su activación; pero los isotipos δ , ϵ , ζ y η no requieren calcio. No existe mucha información sobre la distribución tisular de estos isoenzimas, aunque parece ser que se encuentran ampliamente repartidos.

Al examinar los efectos de los ésteres de phorbol sobre los distintos isotipos de PKC, se ha comprobado que el PMA activa todos los isoenzimas ⁽¹³⁸⁾, pero los requerimientos de calcio difieren de unos a otros isotipos ⁽¹³⁹⁾.

Otro efecto conocido de los ésteres de phorbol es la inhibición de la expresión del antígeno de superficie CD4 ⁽¹⁴⁰⁾ y del TcR, siendo estos efectos

tiempo y dosis-dependientes. Posiblemente, eso sea debido a que faciliten la endocitosis y la degradación lisosomal de tales antígenos⁽¹⁴¹⁾.

Por otra parte, algunos trabajos han demostrado que tanto los timocitos adultos como los fetales (CD4- CD8-), *in vitro*, son capaces de producir IL-2, IL-4 e IFN- γ en respuesta a PMA más ionóforo de calcio; sin embargo, en respuesta a IL-4 más PMA fallan en la producción tanto de IL-2 como de IL-4. Estos hallazgos sugieren que el IFN- γ desempeñaría un papel principal en la inducción de los antígenos del MHC de las células tímicas estromales^(142, 143). Además, parece ser que el cultivo con IL-4 más PMA, alteraría la expresión de antígenos precoces de los timocitos y, por tanto, su capacidad funcional⁽¹⁴⁴⁾.

1.5.2. Fitohemaglutinina.

La fitohemaglutinina (PHA) es una lectina multivalente, derivada de la planta *Phaseolus vulgaris*. Está ampliamente demostrado que es capaz de inducir la activación de las células T^(145, 146), aunque el mecanismo mediante el cual esta lectina activa las células no está totalmente aclarado.

La PHA puede unirse de forma inespecífica a gran número de glicoproteínas de membrana en la superficie de las células T. Parece ser que se liga de forma más específica a la molécula CD2, la cual está ligada al complejo

CD3-TcR⁽¹⁴⁷⁻¹⁴⁹⁾. Es posible, por lo tanto, que la PHA induzca la activación de las células T mediante su unión a una o varias de estas moléculas.

Al igual que sucede en la activación mediada por anticuerpos monoclonales dirigidos contra los marcadores de superficie CD2 o CD3, la activación mediante PHA depende de las células accesorias⁽¹⁵⁰⁾.

El papel de las células accesorias en esta activación, sin embargo, no está claro. Una de las posibilidades que se sugieren es que estas células accesorias actúen como soporte para la PHA, mediante su unión a glicoproteínas de superficie, permitiendo así que la PHA se una a su vez a las moléculas receptoras en la superficie de la célula T. Otras hipótesis apuntan hacia la producción de señales de activación que tienen lugar por contacto directo entre células accesorias y las células T, o bien, hacia la secreción por esas células accesorias de factores solubles que actuarían en la amplificación de la respuesta de las células T⁽¹⁵¹⁾.

En definitiva, la PHA induce una proliferación de las células T dependiente de células accesorias; éstas, a su vez, actuarían formando un microambiente que favorecería dicha estimulación⁽¹⁵²⁾.

Diversos estudios han utilizado la estimulación de las células T humanas mediante PHA para analizar si, en determinadas circunstancias, existe algún defecto en la señal transmembrana.

Así, Lustyik *et al.*⁽¹⁵³⁾, utilizan este tipo de estimulación para observar los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular en pacientes de distintas edades, con el propósito de valorar las posibles causas de la menor respuesta frente a mitógenos de los linfocitos T periféricos en sujetos ancianos.

Schindler *et al.*⁽¹⁵⁴⁾, por su parte, sugieren que el descenso de la respuesta frente a PHA relacionada con la edad se debería, más bien, a un retardo en esa respuesta y no a una verdadera disminución de la misma.

2. MOTIVO Y JUSTIFICACIÓN

La atopia es una condición cada vez más presente en la práctica médica habitual y que claramente difiere de unos individuos a otros en su forma de manifestarse.

La primera evidencia de esa variabilidad se nos presenta al comprobar que algunos individuos se sensibilizan a un único alérgeno mientras que otros lo hacen frente a varios. Apoyando esa afirmación, la respuesta inmune desarrollada en los sujetos sensibilizados frente a varios alérgenos se manifiesta diferente a la que tiene lugar en aquellos que lo están frente a un único alérgeno. De hecho, en estos últimos la respuesta mediada por la IgE es significativamente menos intensa, desarrollándose los síntomas más tarde durante el tiempo de exposición al alérgeno. Incluso, la respuesta a la inmunoterapia específica es mejor en estos pacientes que en los que están polisensibilizados.

Una explicación a esta heterogeneidad puede ser la existencia de varios patrones en la liberación de las citoquinas que juegan un papel primordial en la regulación de la síntesis de la IgE, como son la IL-4 y el IFN- γ .

En los últimos años se han hecho grandes progresos en el conocimiento de las señales celulares y moleculares responsables de la regulación de la síntesis de IgE, como ha quedado reseñado a lo largo de la introducción.

Existe un consenso general acerca del papel fundamental que desempeñan la IL-4 y el IFN- γ como principales citoquinas reguladoras, con efectos contrapuestos sobre dicha síntesis. Además, la función fisiológica de ambas citoquinas ha sido bien establecida, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Del mismo modo, se han publicado numerosos estudios sugiriendo que las células con fenotipo de secreción Th2 (productoras de IL-4 e IL-5 pero no o en cantidades limitadas de IFN- γ), se acumulan en la sangre circulante y/o en los órganos diana de los pacientes que sufren parasitación por helmintos o procesos atópicos. Dicha subpoblación de células, de ese modo, sería responsable en gran medida tanto de la excesiva producción de IgE, como de la eosinofilia que se observan a menudo en estos pacientes.

Los mecanismos responsables de la expansión preferente de estos clones celulares Th2 constituyen un campo abierto a la investigación, y que, de hecho, está suscitando un interés creciente. En este sentido, ya ha podido demostrarse que, dentro de un mismo individuo, las clonas T específicas para distintas clases de antígenos, derivan hacia fenotipos de secreción diferentes según el tipo de antígeno, lo cual pone de manifiesto que existe algún tipo de regulación, seguramente determinado genéticamente, capaz de discriminar los dos tipos de respuesta.

Así pues, podemos pensar que distintos antígenos influyen de formas opuestas en la secreción de citoquinas por las células Th. No obstante, aún queda por establecer si dicha influencia se basa en la estructura molecular del antígeno, en el tipo de célula presentadora de antígenos que interviene en su procesamiento, y/o en la existencia de otros factores del microambiente en el órgano diana donde tiene lugar la respuesta inmunológica.

En individuos atópicos, como hemos visto parece ponerse de manifiesto una mayor tendencia a la diferenciación de las células Th hacia el perfil de secreción Th2, en respuesta a cualquier tipo de estímulo antigénico.

Aunque de forma indirecta, esto nos induce a pensar que los individuos atópicos pueden ser portadores de una alteración en los mecanismos de regulación de la secreción de citoquinas, que conduce a una mayor producción de IL-4. Así, a su vez, dicho aumento en la producción de IL-4 podría ser responsable de la exacerbación de la respuesta IgE que tiene lugar en los individuos atópicos.

La razón por la que los alérgenos inducen una respuesta basada en la secreción de anticuerpos IgE, solamente en esos individuos predispuestos (atópicos) representa todavía una cuestión más compleja. Todo parece indicar que este fenómeno se basa en una serie de factores genéticos; unos ligados al

MHC y otros no asociados al MHC. No obstante, la naturaleza de los genes implicados, así como el mecanismo por cual ejercen su efecto están aún por determinar.

Como hemos visto a lo largo de la introducción, al menos *in vitro*, ha podido comprobarse que la presencia o ausencia de determinadas citoquinas en el microambiente donde tiene lugar la interacción entre el alérgeno y las células Th, pueden tener importantes efectos reguladores en la diferenciación de las células CD4+ hacia el fenotipo de secreción Th1 o el Th2.

Así pues, podríamos decir, en términos generales, que las células con fenotipos de secreción Th1 o Th2 son, respectivamente, supresoras e inductoras de la respuesta alérgica.

Cada una de estas subpoblaciones puede predominar sobre la otra; por lo tanto, existe la posibilidad de que se pueda soslayar la respuesta alérgica induciendo de forma preferente una respuesta Th1 o, al menos, favoreciendo un mayor equilibrio entre ambas subpoblaciones, de forma que se puedan inhibir algunos de las consecuencias de la activación Th2.

Como vemos, una mayor caracterización de los factores que intervienen en la activación selectiva de los clones de células Th1 o Th2, podría ofrecer

amplias posibilidades de manipulación farmacológica de este proceso, llevándonos al posible desarrollo de tratamientos que activen o inhiban selectivamente las subpoblaciones de células Th, *in vivo*.

Por otra parte, dada la creciente importancia que se otorga al papel de la inflamación en los procesos alérgicos y, a su vez, a los linfocitos dentro de ese proceso inflamatorio, nos pareció que un aspecto interesante para el estudio, dentro del curso temporal y de la historia natural de la enfermedad alérgica, era la posible variación del perfil de secreción de linfoquinas en estos pacientes en relación con la exposición alérgica ambiental.

En este sentido, hemos dirigido nuestro trabajo hacia el estudio *in vitro* de las posibles variaciones en la secreción de citoquinas reguladoras de la síntesis de IgE, frente a estímulos inespecíficos, en sujetos atópicos en comparación con individuos sanos, estando sometidos a una exposición alérgica ambiental y después de ella.

Nuestro objetivo en este aspecto sería mostrar, no sólo si existen diferencias entre individuos atópicos y no atópicos, cuestión que ya ha sido ampliamente estudiada, sino también si la secreción de citoquinas en los individuos atópicos, frente a una estimulación inespecífica, es mayor durante el periodo de estimulación antigénica.

Otra posibilidad de estudio, dentro de la respuesta inmunológica de los individuos atópicos, sería la valoración de las posibles diferencias en la estimulación ejercida sobre las células mononucleares de sangre periférica de estos individuos por distintos mitógenos, que actúan por mecanismos diferentes en las vías de activación del linfocito.

De este modo, por un lado, podemos utilizar mitógenos que actúen a nivel del receptor clonotípico de la célula T (v.g., PHA), y, por otro lado, alguno que actúe en pasos posteriores a la estimulación del receptor de la célula T (v.g., los ésteres de phorbol).

Este aspecto podría aportarnos alguna información sobre la posible existencia de determinados pasos en la activación del linfocito que sean más susceptibles a las influencias ambientales en los individuos atópicos que en los individuos no atópicos.

Así pues, la observación de esos distintos aspectos que se abren a la investigación, en la respuesta inmune de los individuos atópicos, han constituido los pilares básicos de nuestro estudio.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Pacientes.

El grupo experimental para nuestro trabajo se formó con individuos que presentaban clínica de rinoconjuntivitis y asma bronquial polínicas, todos ellos pacientes que acudieron a las consultas externas del Servicio de Alergología, en el Hospital Universitario *Virgen Macarena*, en Sevilla.

Para realizar esta selección, consideramos que los pacientes tenían asma bronquial cuando referían una historia de episodios recurrentes de disnea y estertores sibilantes, en los que, de forma espontánea o tras tratamiento con fármacos broncodilatadores, tenía lugar una mejoría parcial o total de los síntomas.

Por su parte, encuadramos como pacientes con rinoconjuntivitis a aquellos que presentaban los síntomas y signos clásicos de este proceso (prurito ocular, hiperemia conjuntival, lagrimeo, sensación de cuerpo extraño ocular, fotofobia).

Tanto en el asma bronquial como en la rinoconjuntivitis, los episodios sintomáticos debían presentarse de forma exclusivamente estacional.

En cada **individuo** se recogieron una serie de datos:

a) Filiación:

- **Nombre**, edad y sexo.

b) Anamnesis detallada:

- **Cuadro clínico**: síntomas y signos de la enfermedad.
- **Años** de evolución del proceso.
- **Intensidad** subjetiva de la clínica.

c) Exploración física general.

d) Estudio analítico general básico. Comprendió:

- **Hemograma**.
- **Perfil** bioquímico general.
- **Analítica** básica de orina.

e) Estudio radiológico convencional de senos paranasales y de tórax.

f) Tests cutáneos mediante la técnica *prick*.

g) Determinación sérica de IgE total e IgE específica, cuando se estimaron **necesarias** para el diagnóstico (realizadas mediante el método *CAP System*[®], fabricado por *Pharmacia*[®], Upsala, Suecia).

En cada paciente se llevaron a cabo, en dos ocasiones, sendas extracciones de sangre venosa periférica, para la realización de cultivos celulares:

- *Tiempo 1 (T1):* habiendo niveles reactivos de pólenes en la atmósfera desde, al menos, tres semanas antes de la extracción.
- *Tiempo 2 (T2):* al menos seis semanas después de que dejaran de detectarse niveles reactivos de pólenes en la atmósfera.

En la *Figura-1* podemos observar de forma gráfica el calendario polínico de la zona, durante la época en la que se llevó a cabo el estudio.

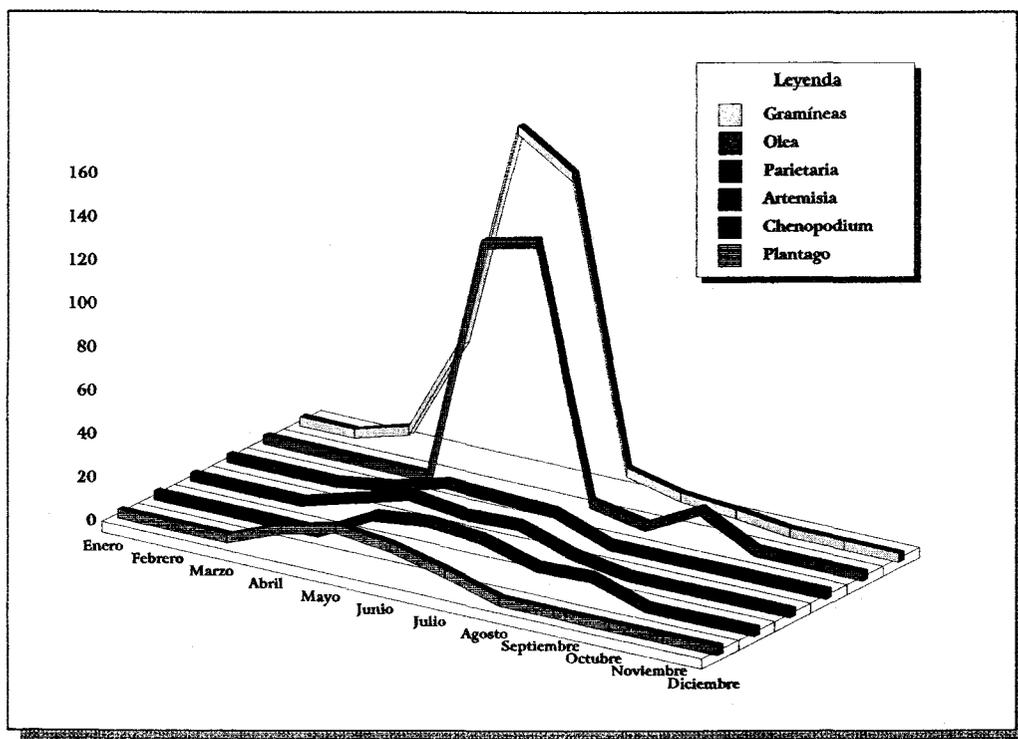


Figura 1. Recuento de pólenes habituales, durante el estudio (granos/m³ de aire).



En el momento de tomar las muestras de sangre, tuvimos en cuenta que, al menos durante las 3 semanas anteriores, los pacientes únicamente hubieran hecho uso de tratamiento sintomático, o bien de tratamiento con inmunoterapia, siempre y cuando llevaran con ésta, al menos, 2 años consecutivos. Aquellos que requirieron tratamiento con fármacos corticoesteroides sistémicos para el control de sus síntomas fueron excluidos del estudio.

El grupo de pacientes, seleccionados con las características expuestas anteriormente, quedó de esa forma constituido por 33 individuos, con edades comprendidas entre 18 y 61 años, siendo su edad media de 28,9 años (error estándar de la media (s.e.m.) +/- 2,48 años).

La distribución atendiendo al sexo (*Figura-2*) fue de 14 varones, con edad media de 24,2 años (s.e.m. +/- 2,50 años), y 19 mujeres con edad media de 37,0 años (s.e.m. +/- 3,61 años).

Todos ellos mostraron en las pruebas cutáneas sensibilización frente a pólenes habituales de nuestro ambiente.

Atendiendo al tratamiento con inmunoterapia específica, dentro del grupo de pacientes atópicos había 8 que recibían este tipo de tratamiento desde hacía, al menos, 2 años.

Los niveles de IgE total detectados en el suero de los pacientes, en el momento de su inclusión en el estudio, osciló entre 59,7 kU/L. y 513 kU/L., con una media de 264 kU/L. (s.e.m. +/- 25,80 kU/L.).

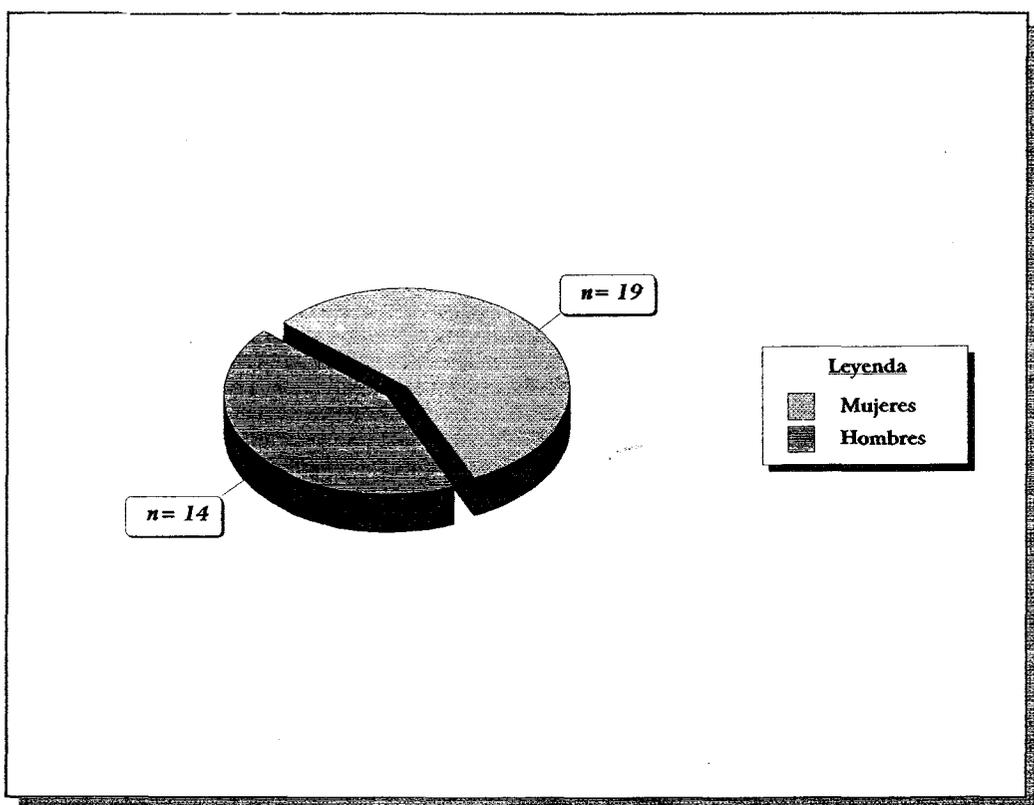


Figura 2. Distribución de los individuos del grupo experimental en cuanto al sexo.

Al mismo tiempo, utilizamos como control a un grupo de 15 voluntarios sanos, sin historia personal ni familiar directa de enfermedades alérgicas, de los que se obtuvieron muestras de sangre periférica en condiciones similares a las detalladas para los pacientes del grupo experimental. Así mismo, dichas muestras se procesaron siguiendo los mismos procedimientos que para las obtenidas a partir de los individuos del grupo de pacientes atópicos.

3.2. Métodos.

3.2.1. Tests cutáneos.

Para su realización se siguió la técnica *prick*, que describimos a continuación, utilizada habitualmente para el diagnóstico etiológico de procesos alérgicos:

☐ Material requerido:

- algodón hidrófilo
- alcohol etílico de 96°
- papel de celulosa absorbente
- lancetas específicas para esta técnica, fabricadas por Dome-Hollister-Stier®.
- extractos alérgicos para diagnóstico mediante *prick*, en solución salina fisiológica con glicerina al 50% y fenol al 0,5%, elaborados por Ifidesa-Arístegui®.

La batería habitual de alérgenos se compone, en nuestro caso, de los siguientes extractos:

Dermatophagoides pteronyssinus y *Dermatophagoides farinae*; *Alternaria alternata* y *Cladosporium herbarum*; escamas dérmicas de perro, escamas dérmicas de gato; mezcla de pólenes de gramíneas silvestres (incluye *Agrostis alba*, *Anthoxanthum odoratum*, *Dactylis glomerata*, *Festuca pratensis*, *Holcus lanatus*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense* y *Poa pratensis*), *Cynodon dactylon*, *Secale cereale* y *Phragmites communis*; *Olea europaea*; *Chenopodium album*, *Artemisia vulgaris* y *Parietaria judaica*. Estos extractos se comercializan a una concentración de 5 UBE (Unidades Biológicas Equivalentes).

Como controles negativo y positivo, utilizamos, respectivamente, solución salina tamponada con 50% de glicerina, y clorhidrato de histamina a concentración de 10 mg/ml..

□ Procedimiento:

Antes de realizar las pruebas cutáneas, desinfectamos la piel de la cara ventral de ambos antebrazos con alcohol etílico utilizando una torunda de algodón hidrófilo, dejándolas secar a continuación.

En la superficie cutánea a utilizar, marcamos tantos puntos como alérgenos se vayan a probar, más otros dos para los controles positivo y negativo, guardando como mínimo 3 cm. de distancia entre ellos.

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

Después de ese proceso, dejamos un periodo de 15 a 20 minutos para que actúe el extracto, una vez transcurrido el cual secamos la superficie de los antebrazos con papel de celulosa absorbente. A continuación, mediante la utilización de una regleta transparente milimetrada, leemos los resultados tomando como referencia los controles positivo y negativo, para valorar el grado de reactividad cutánea de cada sujeto.

Consideramos resultado positivo aquella pápula cuyo diámetro superior fuese, cuando menos, 3 mm. superior a la del control negativo, siempre que el control positivo mostrara una reactividad adecuada.

3.2.2. Recuento de pólenes.

Los recuentos de pólenes en la atmósfera (*Figura-1*), se obtuvieron mediante la utilización del método volumétrico de Hirst, con un aparato

modelo *Spore trap*[®] (Burkard Manufacturing Co, Ltd, Rickmansworth, England).

El citado método volumétrico, propuesto por Hirst en 1952, consiste en un mecanismo que aspira aire ambiental a un débito de 10 litros por minuto, a través de una ranura de 14 mm. de anchura. A una distancia de 1 mm. de esa abertura se dispone un portaobjetos revestido de una sustancia adherente; este portaobjetos se acopla a un sistema de transporte que, mediante un mecanismo de relojería, lo desplaza en sentido longitudinal a una velocidad constante de 2 mm. por hora. El portaobjetos es sustituido cada 24 horas.

El débito de aspiración se realiza mediante un compresor eléctrico y es regulado mediante un caudalímetro. Todo el sistema está unido al eje de giro de una veleta, de forma que la abertura se oriente, de forma constante, en sentido contrario a la dirección del viento.

El área impactada equivale al tamaño de la ranura por el recorrido del portaobjetos en 24 horas (14 mm. x 48 mm.). Conocido el débito de aire y el área impactada, podemos calcular la superficie de impactación de 1 m³ de aire (46,62 mm²). Este dato nos permite extrapolar, una vez hecho el recuento de pólenes en el portaobjetos, la concentración de granos de polen y esporas por metro cúbico de aire.

La identificación y el recuento de los granos de polen se lleva a cabo, mediante microscopía óptica convencional, por personal experto. Para estudiar cada portaobjetos recorreremos el área impactada, por microscopía óptica, mediante un objetivo de inmersión.

En nuestro caso, el microscopio utilizado tiene un diámetro de abertura de 180 μm .; recorriendo los 48 mm. de longitud del área de impactación, la superficie examinada sería de 8,64 mm^2 . De esta forma, conociendo este valor y el de la superficie correspondiente a la impactación de 1 m^3 de aire (46,62 mm^2), podemos calcular un factor de conversión que nos da la concentración de granos de polen por m^3 ($46,62 \text{ mm}^2 / 8,64 \text{ mm}^2 = 5,40$).

Así, el recuento de granos de polen en la superficie examinada multiplicado por 5,40 nos da como resultado la concentración de granos de polen por m^3 de aire.

3.2.3. Determinación de IgE total y específica.

Para realizar estas determinaciones utilizamos la técnica *CAP System*[®]. Se trata de un método *in vitro* para la determinación en fase sólida de la IgE presente en suero.

El fundamento de esta técnica se basa en la presencia de un anticuerpo anti-IgE unido de forma covalente a una fase sólida o *immuno-CAP*. Dicho

anticuerpo, durante el periodo de incubación necesario, actúa como captador de la IgE presente en las muestras, fijándola a dicha fase sólida.

Después de un proceso de lavado para eliminar los restos de las muestras, añadimos a los *inmuno-CAP* un segundo anticuerpo anti-IgE, esta vez marcado con un enzima.

Todo ello dará lugar a la formación de complejos formados por la IgE presente en las muestras y dos anticuerpos que se unen a ella: uno que la fija a la fase sólida (*captador*) y otro que nos va a poner de manifiesto la cantidad de IgE captada (*marcador*).

Después del correspondiente periodo de incubación y un nuevo proceso de lavado para eliminar el exceso del segundo anticuerpo, añadimos el substrato sobre el que va a actuar el enzima del anticuerpo *marcador*.

Finalmente, después de un último periodo de incubación, agregamos una solución *stop* que detiene la reacción, procediendo seguidamente a la lectura de la fluorescencia emitida por cada pocillo en un fluorómetro.

Los reactivos empleados para esta técnica son los siguientes:

- Anti IgE-enzima (β -galactosidasa), antisuero de conejo.
- Solución de lavado: Tween 20 al 0,05% en tampón PBS.

- Solución de desarrollo (*substrato*): 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa.
- Solución de parada (*stop*): ácido sulfúrico 2N.
- Estandars: soluciones con IgE a concentraciones conocidas (0,25; 0,7; 3,5; 17,5; 50 y 100 kU/l.).
- *Inmuno-CAP* anti-IgE (utilizados para la determinación de IgE total y para los estandars), e *inmuno-CAP* con anti-IgE específica para alergenios determinados.

El material requerido para desarrollar la técnica, en parte suministrado por el fabricante, incluye:

- Placas con 96 pocillos para la disposición de los *inmuno-CAP* y de las muestras.
- Placas de lectura, también de 96 pocillos, para la medida de la fluorescencia de las muestras en el fluorómetro.
- Bandejas para la colocación de las placas.
- Dispensador de *inmuno-CAP*.
- *Auto-CAP*: permite la realización de la técnica de forma automática, controlando la dispensación de los reactivos y los periodos de incubación correspondientes.

- *Fluor 96*[®] (fluorímetro).
- Ordenador tipo PC al que se incorpora el programa *Phamas* (Pharmacia[®], Upsala, Suecia), que controla la información sobre las muestras, así como la lectura e interpretación de los resultados obtenidos.
- Micropipetas.
- Puntas de pipeta de plástico para un sólo uso.

El procesamiento de las muestras sigue los pasos que detallamos seguidamente:

- En una bandeja al efecto colocamos dos placas de ensayo y una de lectura.
- A continuación, situamos la bandeja sobre el aparato que nos va a indicar la distribución de los *inmuno-CAP* y de las muestras.
- En la placa de ensayo colocada en posición central, distribuimos los *inmuno-CAP* en las posiciones correspondientes.
- Seguidamente, en la placa de ensayo situada a la izquierda en la bandeja, dispensamos, en los pocillos correspondientes, 50 μ l. tanto de los estandars como de las muestras.

- Una vez concluído ese proceso, pasamos la bandeja al aparato *AutoCAP*, previamente programado, asegurándonos de que tenga dispuestos los reactivos necesarios.
- El siguiente paso consiste en el lavado de los *inmuno-CAP*, que se lleva a cabo de forma automática.
- Transferimos los *inmuno-CAP* ya lavados a los pocillos de la placa que contienen las muestras correspondientes.
- Dejamos un periodo de incubación de 30 minutos.
- Lavamos de nuevo los *inmuno-CAP* y, posteriormente, los pasamos a la placa central en la que, previamente, se han dispensado 50 μ l. de anti-IgE marcado con el enzima.
- A continuación, dejamos otro periodo de incubación de 150 minutos.
- Una vez transcurrido ese tiempo, procedemos a un nuevo lavado de los *inmuno-CAP*.
- Seguidamente, dispensamos 50 μ l. de la solución de desarrollo en la placa de ensayo que queda vacía, y trasladamos los *inmuno-CAP* a dicha placa.

- Dejamos un nuevo periodo de incubación de 15 minutos. Dos o tres minutos antes de finalizar este periodo de incubación, se transfieren los *inmuno-CAP* a la placa de lectura.
- A continuación, dispensamos la solución de parada, y esperamos aproximadamente 2 minutos para que la reacción se detenga totalmente.
- Finalmente, situamos la placa de lectura en el fluorímetro, el cual, una vez leída la placa, envía los datos obtenidos al ordenador. Éste, a su vez, procesa esos datos y calcula las concentraciones de IgE mediante extrapolación a partir de la denominada *curva estándar*, contruida con los valores obtenidos para los estandars. Las concentraciones quedan expresadas en kU/l.

3.2.4. Cultivos celulares.

Para realizar los cultivos con células mononucleares de sangre periférica, se requieren una serie de materiales, tanto para el aislamiento de las células previo a su cultivo, como para constituir el medio de cultivo necesario.

Los componentes del medio de cultivo, en nuestro caso, son los siguientes (entre paréntesis se indican las cantidades relativas de cada sustancia):

- RPMI 1640, sin L-glutamina (100 ml.)
- Suero fetal de carnero (10 ml.)
- HEPES Buffer (2,5 ml.)
- Penicilina-estreptomicina (1,5 ml.)
- L-glutamina (1 ml.)

El material necesario para el aislamiento de las células mononucleares es el siguiente:

- *Ficoll*.
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS).
- *Azul tripán* (medio de tinción celular).
- Pipetas *Pasteur* estériles.
- Puntas de pipeta estériles.
- Tubos cónicos de vidrio estériles.
- Placas de cultivo estériles de 96 pocillos.

Durante la manipulación necesaria para el procesamiento de las muestras hemos de tener en cuenta una serie de normas básicas:

- Toda manipulación debe ser realizada dentro de una cámara de flujo laminar.
- Utilizar guantes estériles en todo momento.
- Al abrir los recipientes que contienen los reactivos, conviene flamear los tapones y los cuellos de los frascos.
- Los tapones debemos dejarlos en posición invertida sobre la superficie en que se trabaja.
- Utilizar puntas de pipeta estériles para cada reactivo.
- Nunca se debe introducir más de 3 veces la misma punta de pipeta en un recipiente.
- Reseñar siempre las fechas de reconstitución en los frascos de los reactivos.
- No conservar el RPMI más de 2 semanas, una vez adicionado.
- No utilizar material esterilizado con óxido de etileno, para eludir el efecto tóxico de dicha sustancia sobre las células.

3.2.4.1. Procedimiento:

a) Aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica:

En primer lugar, extraemos una cantidad suficiente de sangre venosa periférica (en nuestro caso 10 cc.) en tubos heparinizados estériles. A continuación, procesamos la muestra siguiendo los pasos que detallamos a continuación:

- ▶ Diluimos la sangre a 1/2 con PBS estéril.
- ▶ Preparamos tubos cónicos de vidrio estériles dispensando 6 cc. de *Ficoll* en cada uno. En este punto, es importante que el *Ficoll* no resbale por las paredes del tubo dado que es tóxico para los linfocitos.
- ▶ A continuación, depositamos sobre el *Ficoll* la sangre diluída previamente (4 cc. en cada tubo), lentamente y manteniendo el tubo con una inclinación aproximada de 45°; a medida que se va dispensando la sangre diluída, vamos colocando el tubo en posición vertical, de forma que en ningún momento se mezclen la sangre diluída y el *Ficoll*.
- ▶ Con una lámina de plástico tapamos los tubos, para aislar su contenido antes de sacarlos de la cámara de flujo, y los centrifugamos a 2.500 r.p.m. durante 20 min. a temperatura ambiente.

Después de esto, deberían distinguirse diferentes fases en el contenido del tubo: en el fondo quedarían los hematíes; sobre éstos, el *Ficoll*; por encima del *Ficoll*, una *corona* de aspecto blanquecino que agruparía las células mononucleares; y, sobre esta capa quedaría el suero.

- Posteriormente, recogemos la corona de células mononucleares con una pipeta *Pasteur*, realizando la absorción al mismo tiempo que se hace un movimiento rotatorio.

En esta operación, es importante no absorber *Ficoll* ni expulsar el material que se va recogiendo para que éste sea lo más puro posible.

- A continuación, lavamos el material obtenido adicionando PBS a 4° C, lo centrifugamos a 1.500 r.p.m. durante 10 min., y decantamos el sobrenadante. Este mismo proceso de lavado se repite 3 veces.
- Finalmente, para resuspender el material celular obtenido, lo diluimos en 1 ml. de RPMI adicionado con el resto de componentes del medio de cultivo.

b) Contaje de células:

- Para ello, en un primer momento debemos mezclar, en un pocillo de una placa utilizada al efecto, 100 μ l. de la suspensión

celular y 100 μ l. de azul Tripán; esta mezcla se deja reposar unos minutos para que actúe la tinción.

- ▶ Mientras tanto, podemos preparar la cámara de conteo o de Neubauer con un cubreobjetos.
- ▶ A continuación, llenamos la cámara de Neubauer, utilizando una micropipeta, con la cantidad suficiente de la suspensión celular teñida previamente.
- ▶ A través del microscopio óptico, contamos el número de linfocitos que hay en un recuadro enmarcado por líneas triples en la cámara.
- ▶ Con el número obtenido, ajustamos la suspensión de forma que obtengamos la concentración de células deseada.

En nuestro caso, la suspensión celular la ajustaremos a una concentración de células determinada y que será la misma para todos los cultivos (3×10^6 células / ml.). Para ello, primero calculamos la concentración de células que tenemos en la suspensión que hemos teñido (células / ml):

$$X = [\text{contaje (n}^\circ) / \text{vol. de la cámara (ml)}] \times 2 \text{ (dilución al teñir)}$$

Una vez realizada esa operación, calculamos la cantidad de medio de cultivo que deberemos añadir a la suspensión para conseguir la concentración deseada:

$$Y = X / 3 \times 10^6 \text{ (concentración deseada)}$$

Así, Y sería el volumen final al que tenemos que llevar la suspensión celular, mediante la adición de medio de cultivo, para alcanzar la concentración de células que nos hemos propuesto.

c) Cultivo de las células:

- En un primer momento, diseñamos la distribución de las muestras por triplicado en una placa de cultivo de 96 pocillos.
- Después, sembramos en cada pocillo una cantidad fija y determinada de la suspensión celular ajustada (por ejemplo, con 100 μ l. tenemos 3×10^5 células en cada pocillo).
- Una vez sembrada la placa, llevamos cada pocillo a un volumen final de 300 μ l. añadiendo la cantidad suficiente de medio de cultivo.
- Dejamos siempre libres de suspensión celular los pocillos marginales de las placas y los rellenamos con PBS para crear humedad

suficiente en la placa de forma que se evite la evaporación excesiva del medio de cultivo.

- Una vez concluido todo ese proceso, incubamos las placas en estufa a 37° C y en una atmósfera con 5% de CO₂.

3.2.4.2. Diseño del ensayo:

Llevamos a cabo un cultivo celular con las muestras obtenidas de cada paciente, en cada uno de los tiempos que se mencionaron anteriormente (T1 y T2).

En cada placa de cultivo de 96 pocillos sembramos células mononucleares en los pocillos centrales, rellenando los pocillos de los márgenes con PBS para evitar la evaporación excesiva del medio de cultivo.

En cada pocillo de los centrales dispensamos 100 µl. de la suspensión celular ajustada a la concentración establecida previamente, de forma que la cantidad aproximada de linfocitos por pocillo era de 3×10^5 .

A continuación, adicionamos en cada pocillo 200 µl. del medio de cultivo reconstituido, llegando así a un volumen final de 300 µl. en cada pocillo.

Una vez sembrada toda la placa, añadimos los mitógenos según un esquema preestablecido (*Figura-3*):

- los pocillos centrales se distribuirán en 3 grupos, de forma que dispongamos de material suficiente para realizar varias recolecciones de sobrenadante en distintos tiempos (v.g.: a las 24h. y 48h.).
- en dos de los grupos de pocillos dispensamos los mitógenos, dejando el resto con suspensión celular libre de mitógenos.

PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
PBS	Cel.	PBS									
PBS	Cel.	PBS									
PBS	PHA	PBS									
PBS	PHA	PBS									
PBS	PMA	PBS									
PBS	PMA	PBS									
PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Figura 3. Distribución de los mitógenos en la placa de cultivo.

Los mitógenos utilizados fueron, por una parte, PHA a una concentración en el pocillo de 10 $\mu\text{g/ml.}$, y por otra, de forma conjunta, PMA, a concentración final de 0,1 $\mu\text{M.}$, más ionomicina a una concentración final en el pocillo de 1 $\mu\text{M.}$

Seguidamente, cubrimos cada placa con la cubierta de plástico correspondiente proporcionada por el fabricante para evitar en lo posible la contaminación, y la incubamos como se ha dicho anteriormente a 37° C, en atmósfera con 5 % de CO₂ y en la oscuridad.

La recolección de los sobrenadantes la llevamos a cabo a las 24h. y a las 48h. del cultivo, depositando el material así obtenido en alícuotas diferentes para las células no estimuladas, las estimuladas con PHA y las estimuladas con PMA más ionomicina. Dichas alícuotas se congelaron a una temperatura de -20° C hasta su utilización, siempre evitando más de tres ciclos de congelación-descongelación para salvaguardar la exactitud de las determinaciones realizadas.

3.2.5. Determinación de mediadores solubles.

3.2.5.1. Interleuquina 5:

Para determinar la concentración de IL-5 en el sobrenadante de los cultivos utilizaremos la técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) con material fabricado por GIF[®], en Münster, Alemania. Este método se basa en una técnica de *sandwich* que utiliza un anticuerpo monoclonal contra la IL-5, como anticuerpo *captador*, y un segundo anticuerpo monoclonal marcado, que actúa como anticuerpo *detector*.

Este segundo anticuerpo tiene la capacidad de reaccionar por un mecanismo enzimático con la estreptavidin-peroxidasa. La actividad enzimática captada se determina mediante la adición al medio de un sustrato cromógeno de tetrametilbenzidina (TMB) y midiendo la solución coloreada resultante con un espectrofotómetro. De esta forma, la concentración de IL-5 detectada en cada muestra será directamente proporcional al valor de la absorbancia medida.

El material provisto por el fabricante incluye:

- Una placa de plástico con 96 pocillos ya recubiertos con anticuerpo monoclonal anti-IL-5.

- Estandars (*R1*): dos viales que contienen IL-5 humana recombinante liofilizada, con azida sódica al 0,05%. Después de su reconstitución con solución tampón (*R2*), cada vial tendrá una concentración de estándar de 500 pg/ml.
- Solución tampón (*R2*): un vial con 15 ml. de una solución de proteínas (no especificadas por el fabricante) con azida sódica al 0,05%. Se utiliza para diluir los estandars y las muestras.
- Anticuerpo detector (*R3*): un vial con 15 ml. de anticuerpo monoclonal marcado, dirigido contra la IL-5, en una solución proteica (tampoco especificada por el fabricante) con azida sódica al 0,05%.
- Conjugado de estreptavidina (*R4*): dos viales que contienen estreptavidina conjugada a peroxidasa y posteriormente liofilizada, con thimerosal al 0,01%.
- Tampón diluyente del conjugado (*R5*): un vial con 15 ml. de una solución de proteínas (como en los casos anteriores, no detalladas por el fabricante) con thimerosal al 0,01%. Se utiliza para disolver el conjugado de estreptavidina.
- Solución concentrada de TMB (*R6*): un vial de 1 ml. que contiene substrato concentrado de 3,3,5,5-tetrametilbenzidina.

- Tampón para el substrato (*R7*): un vial de 15 ml. con una solución tampón de acetato y peróxido de hidrógeno a pH 5,0 para diluir la solución concentrada de TMB.
- Solución de parada (*R8*): un vial de 7,5 ml. que contiene ácido clorhídrico 2N.
- Tampón de lavado (*R9*): un vial de 50 ml. con una solución tampón (PBS) concentrada para lavar los pocillos de la placa.

Por otra parte necesitamos materiales no proporcionados por la marca comercial, como son micropipetas (0-200 μ l.), pipetas multicanal (50-100 μ l.), un espectrofotómetro con filtro de lectura de 450 nm., y un rotador horizontal para agitar las placas.

Con el material descrito podemos determinar la concentración de IL-5 en el sobrenadante de cultivos celulares, en suero o en plasma.

Las muestras pueden ser almacenadas a una temperatura entre 2°C y 8°C, durante 24 h.. En caso de que no vayan a ser utilizadas en ese periodo de tiempo, es conveniente almacenarlas en alícuotas a -20°C. Para asegurar su correspondencia con los estándares, el fabricante recomienda diluir previamente las muestras a 1:2, con la solución *R2*. Además, antes de comenzar el ensayo, debemos permitir que los reactivos alcancen la temperatura ambiente.

En cuanto a la preparación de los reactivos para su uso, la solución de lavado la conseguimos diluyendo el tampón concentrado de lavado (R9), completando su volumen hasta un litro con agua destilada.

El volumen requerido para los estandars es de 100 μ l. para cada pocillo y deberán sembrarse por duplicado. El estándar liofilizado (R1) se reconstituye con el volumen del diluyente tampón que figura en la etiqueta del vial en cada caso, dejándolo reposar durante 30 minutos.

A continuación, diluimos ese estándar con la solución tampón, para obtener las concentraciones recomendadas que, expresadas en pg/ml., serían las siguientes: 500, 250, 125, 62'5, 31'25, 15'6, 7'8 y 0.

El conjugado liofilizado de estreptavidina lo reconstituimos con el volumen del diluyente correspondiente (R5) que figura en la etiqueta del vial. Igual que en el caso anterior, debemos dejarlo reposar durante 30 minutos. Después, diluimos 240 μ l. de ese conjugado reconstituído en 12 ml. del diluyente (cantidad necesaria para una placa completa).

La solución sustrato debe ser preparada inmediatamente antes de ser utilizada. Para ello, calentamos la solución concentrada de TMB a 37° C y la agitamos para disolver los cristales que puedan formarse. Posteriormente, diluimos 240 μ l. de TMB en 12 ml. del tampón para el sustrato (R7). Una vez preparada, la solución sustrato debemos conservarla a temperatura

ambiente en la oscuridad y deberá ser utilizada en un plazo máximo de 30 minutos.

Cada ensayo debe ser llevado a cabo sin interrupción para evitar el secado de los pocillos de la placa. Igualmente, al dispensar los reactivos hemos de evitar, en lo posible, la formación de burbujas y de gotas adheridas a las paredes de los pocillos.

El procedimiento del ensayo sigue los pasos que detallamos a continuación:

- En primer lugar, antes de dispensar los estandars y las muestras, procedemos al lavado de todos los pocillos tres veces consecutivas. Para ello, dispensamos en cada pocillo 250-300 μl . de la solución de lavado y, a continuación, invertimos la placa y la sacudimos enérgicamente sobre algún recipiente, eliminando el líquido restante colocando la placa invertida sobre un papel de filtro.
- Inmediatamente después del lavado, dispensamos 100 μl . de las muestras diluídas y de los estandars en los pocillos correspondientes, por duplicado. Seguidamente, incubamos la placa durante 45 minutos a temperatura ambiente en el rotador horizontal a 350 rpm. Una vez

transcurrido ese tiempo, realizamos un nuevo lavado como el descrito anteriormente.

- ▶ A continuación, dispensamos 100 μ l. del anticuerpo detector (R3) en cada pocillo, e incubamos la placa durante 45 minutos a temperatura ambiente en el rotador horizontal a 350 rpm. Después de la incubación, realizamos un nuevo proceso de lavado como en los pasos anteriores.
- ▶ Una vez realizado el lavado, dispensamos 100 μ l. del conjugado de estreptavidina en cada pocillo, dejando a continuación otro periodo de incubación de 30 minutos en las mismas condiciones descritas en los pasos anteriores. Posteriormente, realizamos un nuevo lavado.
- ▶ La solución sustrato, como describimos anteriormente, la preparamos inmediatamente antes de utilizarla. Dispensamos 100 μ l. de dicha solución sustrato en cada pocillo, y dejamos un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, en el rotador horizontal a 350 rpm.
- ▶ Para detener la reacción, añadimos 50 μ l. de la solución de parada a cada pocillo; esto da lugar a un viraje de color, del azul al amarillo, en el contenido de los pocillos.
- ▶ Finalmente, mediante un espectrofotómetro, medimos la absorbancia de cada pocillo a 450 nm.. Es conveniente utilizar un filtro

de referencia (620 nm. ó 750 nm.) para compensar posibles variaciones debidas al material de la placa.

Una vez completada la técnica, para calcular los resultados, obtenemos la media de las absorbancias correspondientes a cada estándar y a cada muestra. La absorbancia neta la obtenemos restando de las medias obtenidas anteriormente, la absorbancia de los pocillos que se dejaron como *blancos* (vacíos).

La curva estándar la construimos situando las concentraciones de los estándares en el eje de abscisas de un sistema de coordenadas, frente a las absorbancias netas correspondientes en el eje de ordenadas. Los cálculos son realizados siguiendo una ecuación lineal.

Las concentraciones de IL-5 de cada muestra las obtenemos por extrapolación a partir de dicha curva estándar, multiplicando en cada caso por el factor de dilución correspondiente.

La sensibilidad del método, según el fabricante, es de 1,5 pg de IL-5/ml. En cuanto a su especificidad, refiere que no presenta reactividad cruzada con IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, CSF-GM, CSF-M y CSF-G.

3.2.5.2. Interleuquina 4:

Para determinar la concentración de IL-4 en los sobrenadantes de los cultivos celulares, utilizaremos una técnica de enzimo-inmunoensayo en fase sólida con amplificación de sensibilidad (EASIA), con material fabricado por MEDGENIX® Diagnostics, en Fleurus, Bélgica.

Con este método, utilizamos varios anticuerpos monoclonales dirigidos contra diversos epítopes de la molécula de IL-4. El uso de varios anticuerpos monoclonales diferentes, proporciona mayor especificidad y mayor sensibilidad a la técnica.

Tanto los estándares como las muestras, conteniendo IL-4, reaccionan por una parte con los anticuerpos que recubren los pocillos de plástico, y por otra parte, con otros anticuerpos marcados con peroxidasa de rábano (HRP) que se añaden al medio.

Después de un periodo de incubación, que permite la formación de esas uniones, lavamos los pocillos para eliminar el excedente de anticuerpos marcados con HRP.

A continuación, agregamos una solución de revelado compuesta por tetrametil-benzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno. La reacción que tiene lugar entonces, la detenemos con una solución de parada a base de ácido sulfúrico (H₂SO₄).

Después, leemos los resultados el ensayo mediante un espectrofotómetro, a la longitud de onda apropiada. La cantidad de sustrato detectado se determina mediante técnica de colorimetría, midiendo la absorbancia, la cual será proporcional a las concentraciones de IL-4 existentes en cada pocillo.

Para determinar dichas concentraciones, trazamos una curva estándar y las calculamos por extrapolación a partir de esa curva.

El material proporcionado por el fabricante incluye:

- Una placa de plástico con 96 pocillos ya recubiertos con anticuerpos monoclonales anti-IL-4.
- Cinco viales con los estándares liofilizados, en suero humano con conservante (no especificado por el fabricante). Cada vial lo

reconstituimos con 1 ml. de agua destilada, alcanzando así la

concentración precisa en cada uno (12, 41, 108, 378 y 1318 pg/ml.).

- Estándar 0 pg/ml.: un vial liofilizado que debemos reconstituir mediante la adición de 5 ml. de agua destilada.
- Solución A: dos viales de suero humano liofilizado; para su reconstitución añadimos a cada vial 5 ml. de agua destilada.
- Solución B: un vial con 11 ml. de solución tampón.

- Un vial conteniendo 6 ml. de anticuerpo monoclonal anti-IL-4, conjugado con HRP.
- Controles 1 y 2: dos viales liofilizados de suero humano con merthiolato. Los reconstituimos añadiendo 1 ml. de agua destilada a cada vial.
- Solución de lavado: un vial conteniendo 10 ml. de Tween 20, al 20%. Para su utilización diluimos 2 ml. de esta solución de lavado en 400 ml. de agua destilada, o bien cantidades que mantengan esa misma proporción.
- Cromógeno: un vial con 1 ml. de tetrametil-benzidina (TMB). Antes de su utilización debemos diluir 0,2 ml. de TMB en 1 vial de tampón substrato. Esta preparación se debe realizar de forma extemporánea, dado que tiene la máxima estabilidad en los primeros 15 minutos después de su reconstitución.
- Tampón substrato: tres viales conteniendo 21 ml. de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en tampón de acetato y citrato.
- Solución de parada: un vial conteniendo 6 ml. de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1,8 N.

Otros materiales requeridos, pero que no son proporcionados por el fabricante, son similares a los mencionados para la determinación de IL-5.

La técnica que describimos puede ser utilizada para la determinación de IL-4 tanto en suero, como en plasma y en sobrenadantes de cultivos celulares. Las precauciones a tener en cuenta durante la preparación y conservación de las muestras son semejantes a las descritas anteriormente para la determinación de la IL-5. Del mismo modo, al igual que en otras determinaciones, es conveniente que la técnica se realice por duplicado, siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

- ▶ Para empezar, dispensamos 100 μ l. de cada estándar, control y muestra en los pocillos correspondientes. El tiempo transcurrido entre la distribución del primer estándar y de la última muestra no debe ser superior a los 30 minutos si queremos preservar la exactitud del ensayo.
- ▶ Posteriormente, agregamos 100 μ l. de la *solución B* en los pocillos que contienen los estándares y los controles, y 100 μ l. de la *solución A* en los pocillos que contienen las muestras de sobrenadante de los cultivos celulares.
- ▶ A continuación, añadimos 50 μ l. de anti-IL-4 conjugado con HRP, en todos los pocillos.
- ▶ Después de esto, incubamos la placa durante dos horas a temperatura ambiente, en un rotador horizontal, aproximadamente a



700 +/- 100 rpm., evitando que incida la luz solar directamente sobre ella.

- Una vez transcurrido este tiempo, lavamos la placa vaciando el líquido de cada pocillo, dispensando a continuación 400 μ l. de la solución de lavado en los pocillos, y vaciándolos nuevamente. Este procedimiento se realiza tres veces consecutivas.
- En el siguiente paso, añadimos 200 μ l. de la solución cromógena a cada pocillo e incubamos la placa durante 30 minutos, en condiciones semejantes a la incubación anterior.
- Una vez transcurrido ese tiempo, agregamos 50 μ l. de la solución de parada en cada pocillo. Después de ésto, ya podemos leer la absorbancia de cada pocillo dentro de un plazo máximo de tres horas.

Para ello, utilizamos el espectrofotómetro con un filtro de medida de 450 nm. de longitud de onda; además, es recomendable la utilización de un filtro de referencia de 630 ó 650 nm..

Con los valores obtenidos para los estandars, mediante una función de cuatro parámetros, podemos construir la curva estándar, a partir de la cual, por interpolación, calculamos las concentraciones de las muestras.

La concentración mínima detectable con esta técnica, según la estimación del fabricante, es 2 pg/ml.. Del mismo modo, refiere que no se ha observado reactividad cruzada en presencia de IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, TNF- α , TNF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , IL-10, CSF-GM y CSF-G.

3.2.5.3. Interferón γ :

Para determinar la concentración de IFN- γ en el sobrenadante de los cultivos celulares utilizamos la técnica EASIA, como para la determinación de IL-4, con material fabricado igualmente por MEDGENIX® Diagnostics, en Fleurus, Bélgica.

En este caso, el material proporcionado por el fabricante incluye:

- Una placa de plástico con 96 pocillos recubiertos con anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ .
- Estándar 0: tres viales con suero humano liofilizado con merthiolato sódico. Los reconstituimos añadiendo 8 ml. de agua destilada en cada vial.
- Estandars 1-5: cinco viales en suero humano liofilizado, con merthiolato sódico. Para conseguir la concentración precisa de cada

estándar (1, 2, 5, 10, 30 UI/ml.), añadimos 1 ml. de agua destilada a cada uno de los viales.

- Controles 1 y 2: dos viales liofilizados en suero humano con merthiolato sódico; se deben reconstituir mediante la adición de 1 ml. de agua destilada a cada vial.
- Anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ conjugado con HRP: un vial con 6 ml. en tampón con tris-ClH, albúmina sérica bovina y conservantes no especificados por el fabricante.
- Solución de lavado: un vial con 10 ml. de Tween 20, al 20%. Para su utilización diluimos 2 ml. de esta solución en 400 ml. de agua destilada, o bien otras cantidades que guarden esa misma proporción.
- Solución cromógena: un vial con 1 ml. de TMB. Antes de su utilización, diluimos 0,2 ml. de esta solución en un vial completo de tampón substrato. Esta preparación debe ser extemporánea, ya que mantiene su máxima estabilidad en los primeros 15 minutos.
- Tampón substrato: tres viales con 21 ml. de H₂O₂ en tampón de citrato / acetato.
- Solución de parada: un vial con 6 ml. de H₂SO₄, 1,8 N.

Igual que en las técnicas descritas para IL-4 e IL-5, son necesarios otros materiales no proporcionados por el fabricante, que coinciden con los ya mencionados.

En ese mismo sentido, las precauciones a seguir en el manejo y conservación de las muestras son también semejantes a las descritas. Sin embargo, en este caso, para la determinación de IFN- γ en sobrenadante de cultivos celulares, el fabricante recomienda diluir las muestras, al menos, a 1:4 antes de su utilización en el ensayo.

El procedimiento a seguir con esta técnica varía poco del descrito anteriormente para la IL-4:

- ▶ En un primer paso, dispensamos 50 μ l. de cada estándar, control y muestra en los pocillos correspondientes.
- ▶ A continuación, añadimos en cada pocillo 50 μ l. de anticuerpo anti-IFN- γ , conjugado con HRP. Después de esto, dejamos un periodo de incubación de 2 horas a temperatura ambiente, en un rotador horizontal a 700 +/- 100 rpm., y evitando que incida de forma directa la luz sobre la placa.
- ▶ Una vez transcurrido ese tiempo, lavamos la placa de forma idéntica a la detallada con anterioridad en las otras técnicas.

- En el siguiente paso, dispensamos en cada pocillo 200 μl . de la solución cromógena e incubamos la placa durante 15 minutos en las mismas condiciones que la incubación anterior.
- A continuación, añadimos en cada pocillo 50 μl . de la solución de parada.

Posteriormente, medimos la absorbancia en el espectrofotómetro y calculamos las concentraciones de IFN- γ siguiendo el mismo procedimiento descrito para la determinación de IL-4.

3.2.6. Tratamiento estadístico.

En este apartado, hemos empleado los métodos estadísticos que se consideraron más apropiados en cada caso.

En este sentido, comprobamos en cada variable si la serie de datos obtenida se ajustaba o no a una distribución normal.

Posteriormente, recurrimos a la utilización de pruebas no paramétricas cuando se comprobaba que la distribución ligada a una variable no se ajustaba a la normalidad ^(155, 156). En nuestro estudio, esta circunstancia se ha visto

favorecida dado que, ni los grupos de pacientes ni el grupo control sobrepasan los 25 individuos.

La medida de tendencia central utilizada para expresar los resultados obtenidos ha sido la *media aritmética*; por su parte, la dispersión de los datos la expresamos mediante el *error estándar de la media* (s.e.m.), el cual viene determinado tanto por la desviación estándar como por el tamaño de la muestra ⁽¹⁵⁷⁾.

Para comparar las posibles diferencias existentes entre los datos obtenidos en el T1 y los obtenidos en el T2, recurrimos a la prueba *t de Student* para casos apareados, cuando la distribución se ajustaba a la normalidad, o a la *Z de los rangos-signos de Wilcoxon*, en caso contrario. Ambas son pruebas utilizadas para la comparación de dos grupos con datos apareados; esto es así porque, en nuestro caso, no podemos considerar que la población estudiada en T1 y la población estudiada en T2 sean independientes.

Por otro lado, para comparar los datos obtenidos en el grupo de pacientes frente a los obtenidos en el grupo control, utilizamos la prueba *U de Mann-Whitney*, otra prueba no paramétrica dirigida a la comparación de dos grupos con datos independientes.

Finalmente, quisimos medir la intensidad de la asociación observada entre algunas de las variables estudiadas y comprobar si, en realidad, era mayor de lo que podría esperarse únicamente por la casualidad. Con este propósito se llevó a cabo un análisis de correlación, utilizando para ello la prueba ρ de correlación de rangos de Spearman.

En todos los casos, se adoptó como nivel de significación estadística $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Interferón- γ .

La determinación de los niveles de IFN- γ en el sobrenadante de los cultivos de PBMC, en los pacientes atópicos sin inmunoterapia arrojó los resultados que detallamos a continuación:

- En los cultivos realizados durante la época en que existían niveles reactivos de pólenes en la atmósfera (T1), transcurridas 24 h. después de haber sido estimuladas las células con los mitógenos correspondientes, se detectaron los valores que se pueden observar en la *Tabla-1*.

El sobrenadante de las células que se dejaron sin estimular con mitógenos presentó, a las 24 h., una concentración media de IFN- γ de 3,33 UI/ml. (s.e.m. +/- 1,36), mientras en las estimuladas con PHA la concentración media alcanzó las 36,85 UI/ml. (s.e.m. +/- 10,93) y en las estimuladas con PMA e ionomicina fue de 970,06 UI/ml. (s.e.m. +/- 203,41).

Pacientes	Cel.-T1	Cel.-T2	PHA-T1	PHA-T2	PMA-T1	PMA-T2
1	6,78	16,51	113,69	183,37	1800,00	2025,00
2	5,95	4,86	14,64	63,13	875,00	475,00
3	3,01	33,82	5,95	129,96	325,00	4975,00
4	5,14	4,72	71,55	28,19	350,07	216,78
5	5,69	3,43	21,30	25,67	4400,00	3650,00
6	0,00	0,00	107,65	114,68	825,00	500,00
7	29,30	0,00	101,65	132,38	875,00	135,03
8	0,00	12,13	0,00	48,98	300,00	725,00
9	0,00	0,00	107,93	300,00	800,00	300,00
10	0,00	26,40	25,30	25,95	775,00	65,95
11	0,00	38,11	8,60	60,74	410,00	1025,00
12	19,17	6,07	0,00	14,51	110,00	600,00
13	0,00	3,64	0,00	6,63	600,00	700,00
14	1,12	0,00	0,00	64,14	260,00	1400,00
15	0,00	0,00	3,02	79,71	750,00	36,08
16	1,40	0,00	5,07	6,22	69,38	93,81
17	1,12	1,12	1,50	37,70	450,00	600,00
18	0,07	1,40	20,00	50,65	2371,00	15,78
19	0,80	2,38	0,74	144,00	383,00	606,00
20	0,86	0,39	0,54	0,75	23,00	286,00
21	0,49	0,00	85,00	0,00	1450,00	1100,00
22	0,00	0,00	3,46	0,00	525,00	550,00
23	0,00	0,00	12,00	0,54	1450,00	1874,00
24	2,31	0,96	211,73	107,00	3050,00	2150,00
25	0,00	1,16	0,00	1,36	1025,00	275,00

Tabla 1. Concentración de IFN- γ (UI/ml.) en los sobrenadantes a las 24h. de cultivo, en el grupo de pacientes polínicos.

► Del mismo modo, se realizaron determinaciones semejantes a las anteriores en los sobrenadantes de los cultivos de PBMC obtenidos fuera de la época en la que existían niveles reactivos de pólenes en la atmósfera (T2); los resultados de éstas se detallan también en la *Tabla-1*.

En este caso, la concentración media de IFN- γ detectada en el sobrenadante de las células no estimuladas de 6,28 UI/ml. (s.e.m. +/- 2,18), de 65,05 UI/ml. (s.e.m. +/- 14,41) en las estimuladas con PHA, y de 975,18 UI/ml. (s.e.m. +/- 237,92) en las cultivadas con PMA más ionomicina.

► Al comparar los datos anteriores entre sí, observamos que no existía diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de IFN- γ observadas en los sobrenadantes de las células no estimuladas ($p=0,4209$), ni tampoco en las estimuladas con PMA más ionomicina ($p=0,4593$). Por el contrario, sí había significación estadística en la diferencia observada entre los valores obtenidos para las células estimuladas con PHA ($p=0,0138$).

La representación gráfica de estas diferencias la podemos observar en la *Figura-4*.

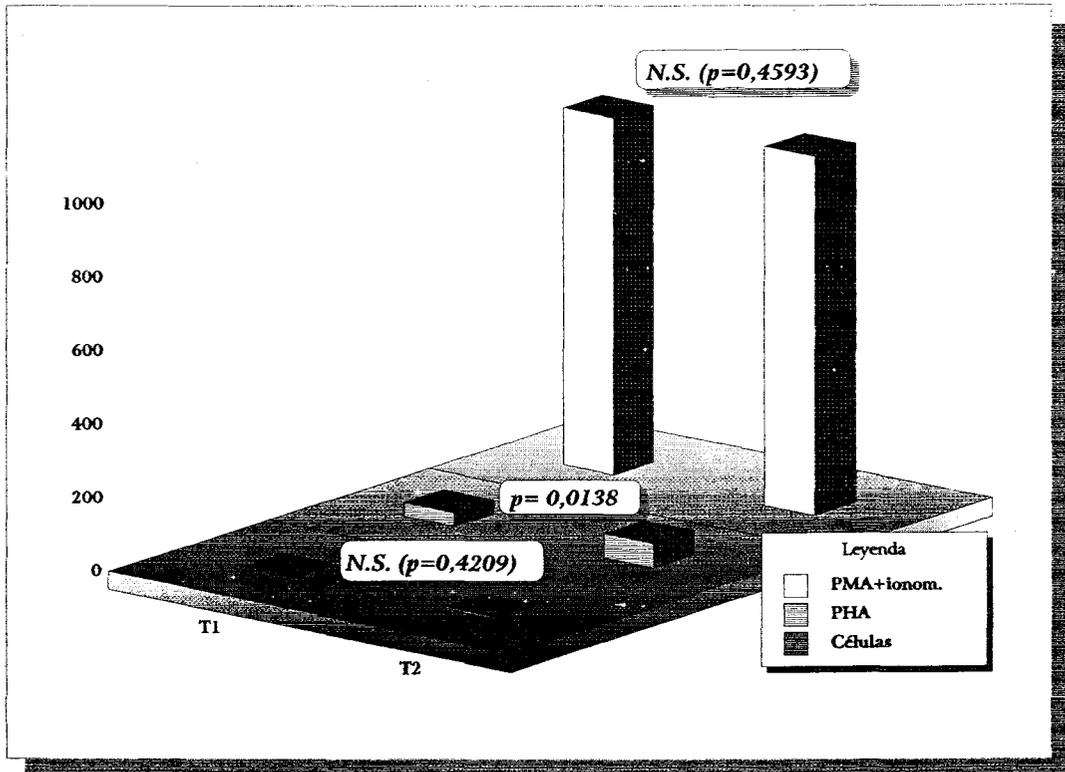


Figura 4. Comparación entre las medias de las concentraciones de IFN- γ (UI/ml) detectadas en T1 y en T2, a las 24 h. de cultivo.

Los mismos parámetros fueron calculados con las concentraciones de IFN- γ detectadas en el sobrenadante de los cultivos celulares, tras 48 h. de su estimulación con los mitógenos; dichas concentraciones quedan detalladas en la *Tabla-2*.

Pacientes	Cel.-T1	Cel.-T2	PHA-T1	PHA-T2	PMA-T1	PMA-T2
1	10,40	116,37	2425,00	2550,00	3550,00	6250,00
2	6,90	5,35	87,65	1350,00	725,00	1275,00
3	5,14	233,38	8,16	450,00	1525,00	9525,00
4	4,50	4,79	160,25	41,89	2875,00	1025,00
5	6,02	135,75	283,39	326,11	3100,00	4300,00
6	0,00	0,00	148,88	400,00	1550,00	1275,00
7	0,00	0,00	1150,00	1375,00	1900,00	1050,00
8	0,00	20,78	0,00	227,43	1075,00	1475,00
9	0,00	19,93	650,00	1350,00	1550,00	1050,00
10	0,00	91,33	80,25	29,20	1625,00	21,02
11	1,87	44,81	18,39	49,35	450,00	1225,00
12	0,00	4,73	14,35	12,64	400,00	700,00
13	0,00	10,11	0,00	15,00	1175,00	1000,00
14	0,00	0,00	0,00	725,00	275,00	4575,00
15	1,96	0,90	55,08	131,13	1800,00	150,00
16	3,11	0,51	19,76	370,00	275,00	250,00
17	1,59	1,68	3,55	725,00	2025,00	1925,00
18	0,07	1,33	650,00	0,40	3050,00	23,00
19	0,69	3,12	5,17	925,00	2125,00	1000,00
20	3,86	0,37	4,74	1,30	750,00	2200,00
21	3,05	0,00	2,36	0,00	2250,00	1275,00
22	0,00	0,00	10,00	0,72	3125,00	850,00
23	0,08	0,00	141,00	0,87	3150,00	3625,00
24	23,05	0,95	300,00	211,00	6500,00	1825,00
25	0,00	1,55	0,00	2,69	2200,00	675,00

Tabla 2. Concentración de IFN- γ (UI/ml.) en los sobrenadantes a las 48h. de cultivo, en el grupo de pacientes polínicos.

► La media de las concentraciones alcanzadas en este caso fue de 2,89 UI/ml. (s.e.m. +/- 1,00) en el sobrenadante de las células no estimuladas, 248,72 UI/ml. (s.e.m. +/- 106,13) para las estimuladas con PHA, y 1961,00 UI/ml. (s.e.m. +/- 273,43) en las estimuladas con PMA e ionomicina, todo ello en el T1.

► En el T2, la concentración de IFN- γ en el sobrenadante de las células sin mitógenos, alcanzó niveles medios de 27,91 UI/ml. (s.e.m. +/- 11,42). En lo que respecta a las células cultivadas con PHA, la media de las concentraciones detectadas fue de 434,95 UI/ml. (s.e.m. +/- 127,67), y en el material obtenido tras la estimulación con PMA más ionomicina fue de 1941,76 UI/ml. (s.e.m. +/- 438,80).

► Como en el caso anterior, para comprobar si existían diferencias entre T1 y T2, se compararon, desde el punto de vista estadístico, los valores obtenidos.

De este modo, pudimos observar que la diferencia no era estadísticamente significativa al considerar los valores obtenidos para las células cultivadas, tanto en presencia de PHA ($p=0,0615$), como de PMA más ionomicina ($p=0,4593$) (*Figura-5*).

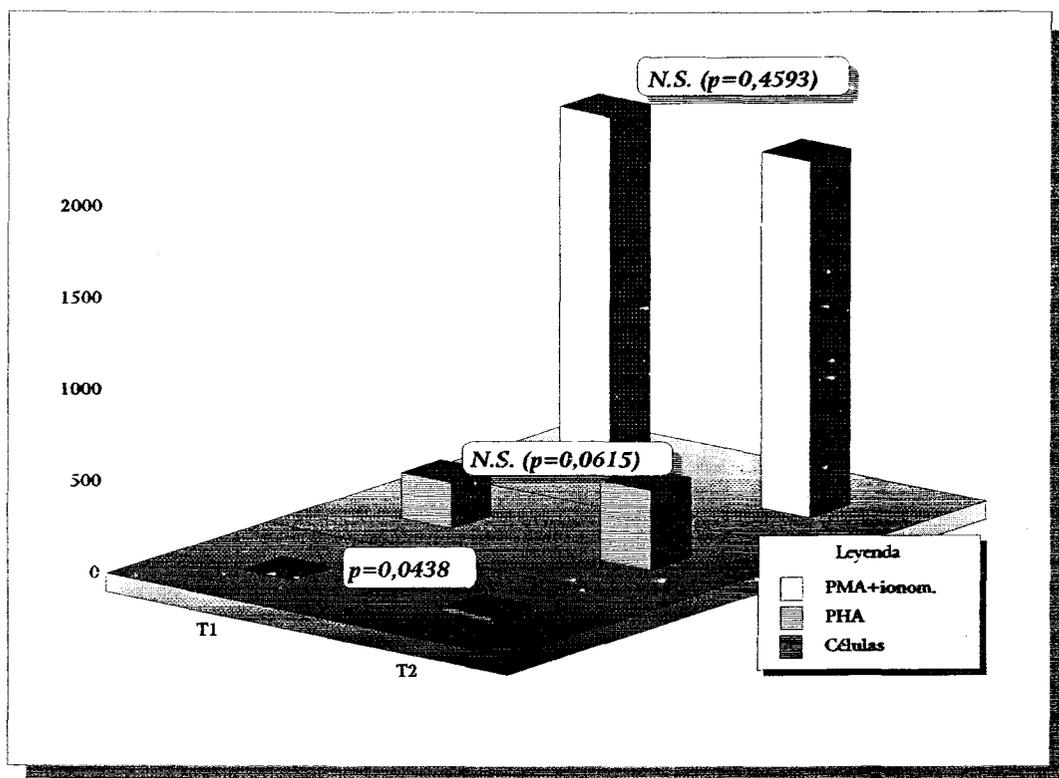


Figura 5. Comparación entre las medias de las concentraciones de IFN- γ (UI/ml) detectadas en T1 y en T2, a las 48 h. de cultivo.

► Además de los cálculos anteriores, quisimos estudiar las posibles variaciones de los resultados si consideráramos, en cada caso, los niveles máximos de IFN- γ alcanzados, ya fueran éstos a las 24 h. o a las 48 h. de realizar los cultivos de PBMC.

Los datos sufrían algunas variaciones en su distribución, como puede observarse en la *Tabla-3*.

Pacientes	Cel.-T1	Cel.-T2	PHA-1	PHA-2	PMA-1	PMA-2
1	10,40	116,37	2425,00	2550,00	3550,00	6250,00
2	6,90	5,35	87,65	1350,00	875,00	1275,00
3	5,14	233,38	8,16	450,00	1525,00	9525,00
4	5,14	4,79	160,25	41,89	2875,00	1025,00
5	6,02	135,75	283,39	326,11	4400,00	4300,00
6	0,00	0,00	148,88	400,00	1550,00	1275,00
7	29,30	0,00	1150,00	1375,00	1900,00	1050,00
8	0,00	20,78	0,00	227,43	1075,00	1475,00
9	0,00	19,93	650,00	1350,00	1550,00	1050,00
10	0,00	91,33	80,25	29,20	1625,00	65,95
11	1,87	44,81	18,39	60,74	450,00	1225,00
12	19,17	6,07	14,35	14,51	400,00	700,00
13	0,00	10,11	0,00	15,00	1175,00	1000,00
14	1,12	0,00	0,00	725,00	275,00	4575,00
15	1,96	0,90	55,08	131,13	1800,00	150,00
16	3,11	0,51	19,76	370,00	275,00	250,00
17	1,59	1,68	3,55	725,00	2025,00	1925,00
18	0,07	1,40	650,00	50,65	3050,00	23,00
19	0,80	3,12	5,17	925,00	2125,00	1000,00
20	3,86	0,39	4,74	1,30	750,00	2200,00
21	3,05	0,00	85,00	0,00	2250,00	1275,00
22	0,00	0,00	10,00	0,72	3125,00	850,00
23	0,08	0,00	141,00	0,87	3150,00	3625,00
24	23,05	0,96	300,00	211,00	6500,00	2150,00
25	0,00	1,55	0,00	2,69	2200,00	675,00

Tabla 3. Concentración máxima de IFN- γ (UI/ml.) en los sobrenadantes de los cultivos, en el grupo de pacientes polínicos.

Así, la concentración de IFN- γ en el sobrenadante de las células cultivadas sin mitógenos, alcanzaba por término medio valores de 4,93 UI/ml. (s.e.m. +/- 1,56) en el T1, llegando a 27,97 UI/ml. (s.e.m. +/- 11,42) en el T2.

Igualmente, en el caso de las PMBC estimuladas con PHA, los valores medios alcanzados en T1 fueron de 252,02 UI/ml. (s.e.m. +/- 105,86), mientras que en T2 eran de 453,33 UI/ml. (s.e.m. +/- 126,07).

Siguiendo el mismo procedimiento para los datos obtenidos tras la estimulación con phorbol-éster más ionomicina, la concentración media de IFN- γ , en el T1, era de 2019,00 UI/ml. (s.e.m. +/- 286,00), y de 1956,72 UI/ml. (s.e.m. +/- 438,49) en el T2.

► Al comprobar si la nueva serie de datos obtenida presentaba diferencias estadísticamente significativas entre T1 y T2 (*Figura-6*), encontramos que solamente existía tal diferencia en el caso de las células estimuladas con la adición al medio de cultivo de PHA ($p=0,0303$), siendo su concentración, por lo tanto, significativamente mayor en T2. No sucedía lo mismo con las células sin estimular ($p=0,2802$), ni con las células estimuladas mediante PMA más ionomicina ($p=0,3129$), en las que la diferencia no fue significativa.

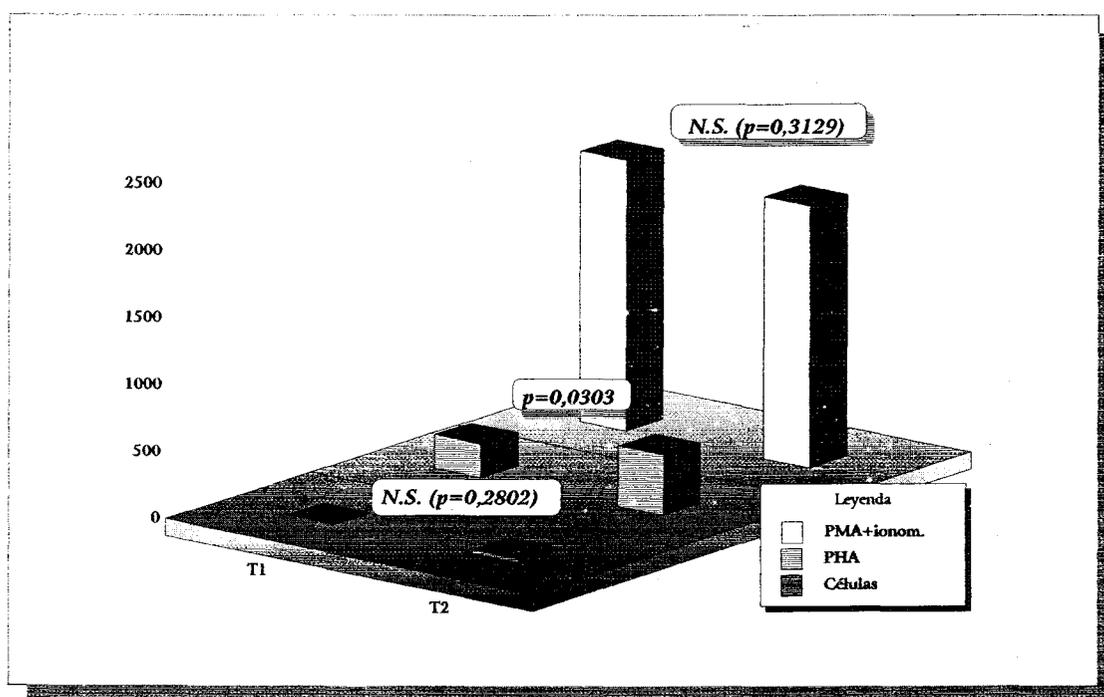


Figura 6. Comparación entre las concentraciones máximas de IFN- γ (UI/ml) detectadas en el sobrenadante de los cultivos, en el grupo de pacientes polínicos.

En una fase posterior del estudio quisimos comprobar si las diferencias detectadas, y señaladas en los resultados anteriores, se mostraban igualmente en los pacientes que estaban recibiendo inmunoterapia:

- Con ese propósito, llevamos a cabo la determinación de IFN- γ en los sobrenadantes de las células cultivadas con PHA a las 24 h. de cultivo; los resultados se muestran en la *Tabla-4*.

<i>Pacientes</i>	<i>PHA-T1</i>	<i>PHA-T2</i>
1	134,00	222,00
2	0,00	6,10
3	1,80	47,00
4	0,90	180,00
5	0,80	2,80
6	1,10	56,00
7	2,50	169,00
8	1,60	43,00

Tabla 4. Concentración de IFN- γ (UI/ml.) en los sobrenadantes a las 24h. de cultivo, en el grupo de pacientes que recibían inmunoterapia.

► El tratamiento estadístico de esta nueva serie de datos nos mostró que también existía diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones detectadas en T1 y en T2 ($p=0.008$).

Por su parte, los resultados correspondientes al grupo control mostraron a las 24 h. y 48 h. de cultivo las cifras que se detallan en la *Tabla-5* y en la *Tabla-6*, respectivamente.

Controles	Cel.-T1	Cel.-T2	PHA-T1	PHA-T2	PMA-T1	PMA-T2
1	1,35	1,59	38,00	2,31	467,00	215,00
2	0,63	0,00	24,00	0,00	584,00	173,00
3	1,75	0,00	2,86	0,00	164,00	475,00
4	0,00	0,00	52,50	0,00	925,00	2.375,00
5	1,44	0,00	6,02	0,00	1,43	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00	3.312,00	2.507,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00	77,00	107,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00	52,00	82,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	368,00	625,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00	752,00	803,00
11	0,00	0,00	0,00	0,00	936,00	1.117,00
12	0,00	0,00	0,00	0,00	856,00	704,00
13	0,00	0,00	0,00	0,00	726,00	628,00
14	0,00	0,00	0,00	0,00	608,00	743,00
15	0,00	0,00	0,00	0,00	503,00	432,00

Tabla 5. Concentración de IFN- γ (UI/ml.) en los sobrenadantes a las 24h. de cultivo, en el grupo control.

Controles	Cel.-T1	Cel.-T2	PHA-T1	PHA-T2	PMA-T1	PMA-T2
1	1,90	1,46	12,40	2,74	3.125,00	119,03
2	1,18	0,00	12,90	0,00	750,00	1.425,00
3	1,43	0,00	3,31	8,97	1.675,00	625,00
4	0,00	0,00	6,85	3,58	2.025,00	4.275,00
5	12,00	0,00	1,54	0,00	139,80	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00	1.532,00	1.906,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00	668,00	732,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00	240,00	304,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	504,00	503,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00	460,00	520,00
11	0,00	0,00	0,00	0,00	2.079,00	2.304,00
12	0,00	0,00	0,00	0,00	1.980,00	2.120,00
13	0,00	0,00	0,00	0,00	3.080,00	2.840,00
14	0,00	0,00	0,00	0,00	15.721,0	1.704,00
15	0,00	0,00	0,00	0,00	762,00	825,00

Tabla 6. Concentración de IFN- γ (UI/ml.) en los sobrenadantes a las 48h. de cultivo, en el grupo control.

La comparación del T1 y del T2 de los valores citados (*Figura-7* y *Figura-8*) nos mostró que no existían diferencias con significación estadística ($p > 0,05$) entre las concentraciones de IFN- γ en los sobrenadantes de los cultivos celulares del grupo de individuos sanos.

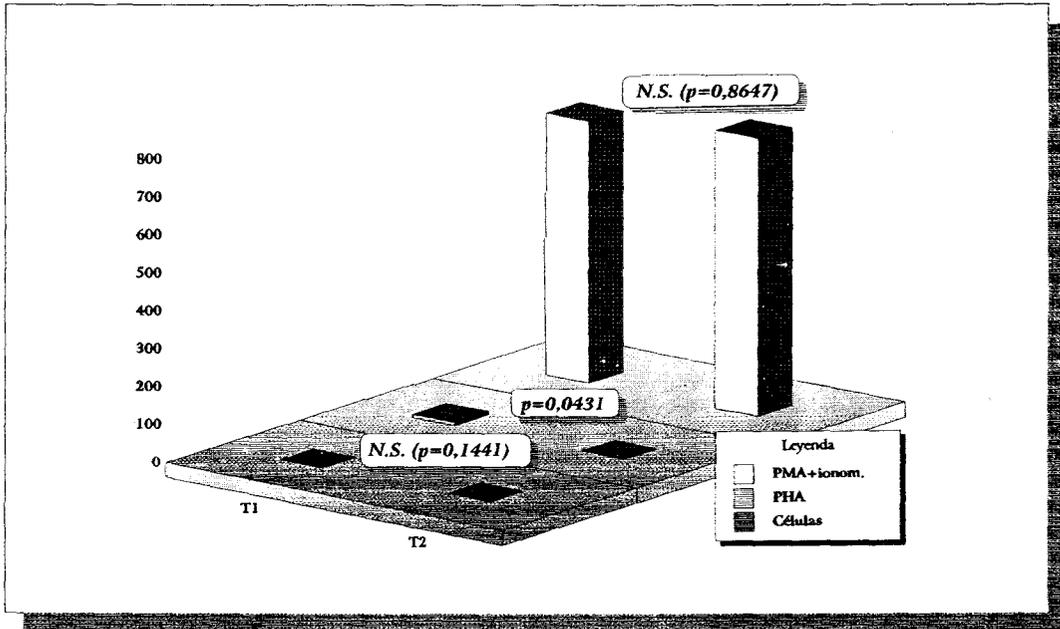


Figura 7. Comparación entre las concentraciones de IFN-γ (UI/ml) detectadas en los sobrenadantes a las 24 h. de cultivo, en el grupo control.

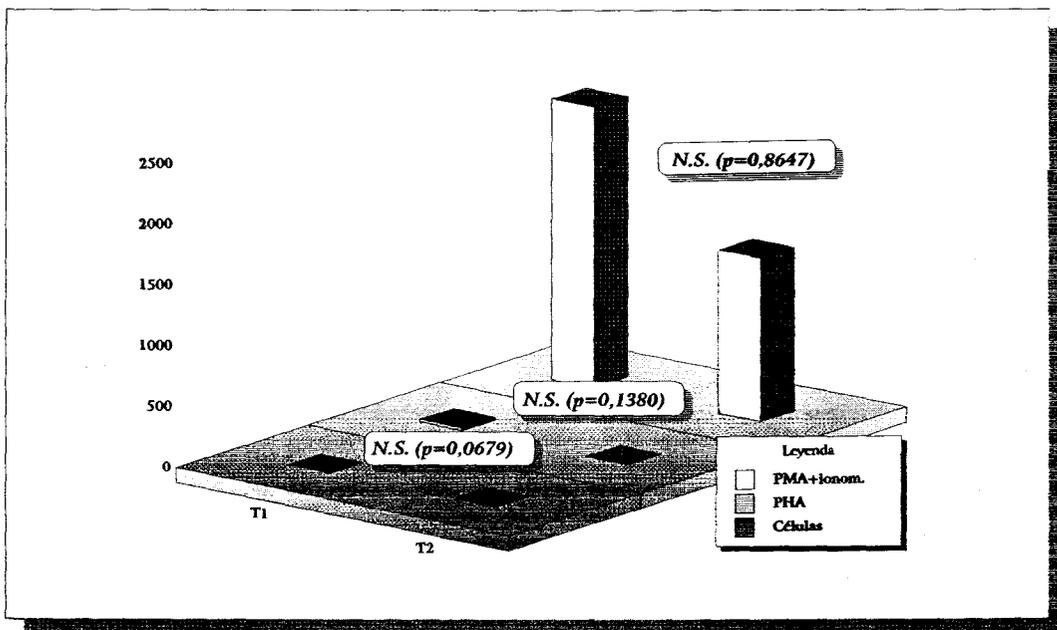


Figura 8. Comparación entre las concentraciones de IFN-γ (UI/ml) detectadas en los sobrenadantes a las 48 h. de cultivo, en el grupo control.



Los valores máximos de la concentración de IFN- γ alcanzados por los controles figuran en la *Tabla-7*.

Controles	Cel.-T1	Cel.-T2	PHA-T1	PHA-T2	PMA-T1	PMA-T2
1	1,90	1,59	12,40	2,74	3.125,00	215,00
2	1,18	0,00	12,90	0,00	750,00	1.425,00
3	1,75	0,00	3,31	8,97	1.675,00	625,00
4	0,00	0,00	6,85	3,58	2.025,00	4.275,00
5	12,00	0,00	6,02	0,00	139,00	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00	3.312,00	2.507,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00	668,00	107,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00	240,00	304,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	504,00	625,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00	752,00	803,00
11	0,00	0,00	0,00	0,00	2.079,00	2.304,00
12	0,00	0,00	0,00	0,00	1.980,00	2.120,00
13	0,00	0,00	0,00	0,00	3.080,00	2.840,00
14	0,00	0,00	0,00	0,00	15.721,0	1.704,00
15	0,00	0,00	0,00	0,00	762,00	825,00

Tabla 7. Concentración máxima detectada de IFN- γ (UI/ml) en los sobrenadantes de los cultivos, en el grupo control.

► En este caso, la comparación entre los valores obtenidos en la época de polinización y fuera de ella, tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (Figura-9).

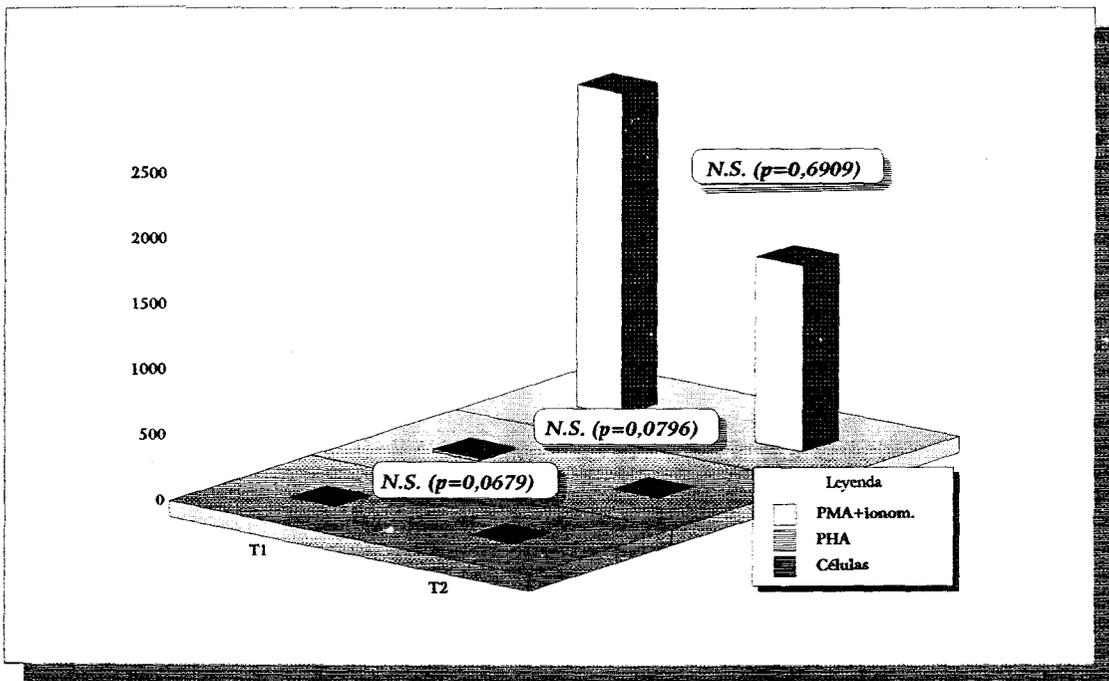


Figura 9. Comparación entre las concentraciones máximas de IFN- γ (UI/ml) detectadas en los sobrenadantes de los cultivos, en el grupo control.

► Comparando los datos obtenidos, en cada caso, para los pacientes sin inmunoterapia y para los controles (Figuras-10, 11 y 12), las diferencias eran estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las concentraciones de IFN- γ

obtenidas en células sin estimular tanto a las 24 h. de cultivo como a las 48 h. y, a su vez, tanto en T1 como en T2. Lo mismo ocurrió al comparar los resultados correspondientes a las células cultivadas en presencia de PHA.

Sin embargo, las diferencias existentes en las concentraciones de IFN- γ , entre pacientes y controles, no se mostraron con significación estadística, en ningún caso, cuando las células habían sido estimuladas con PMA más ionomicina ($p > 0,05$).

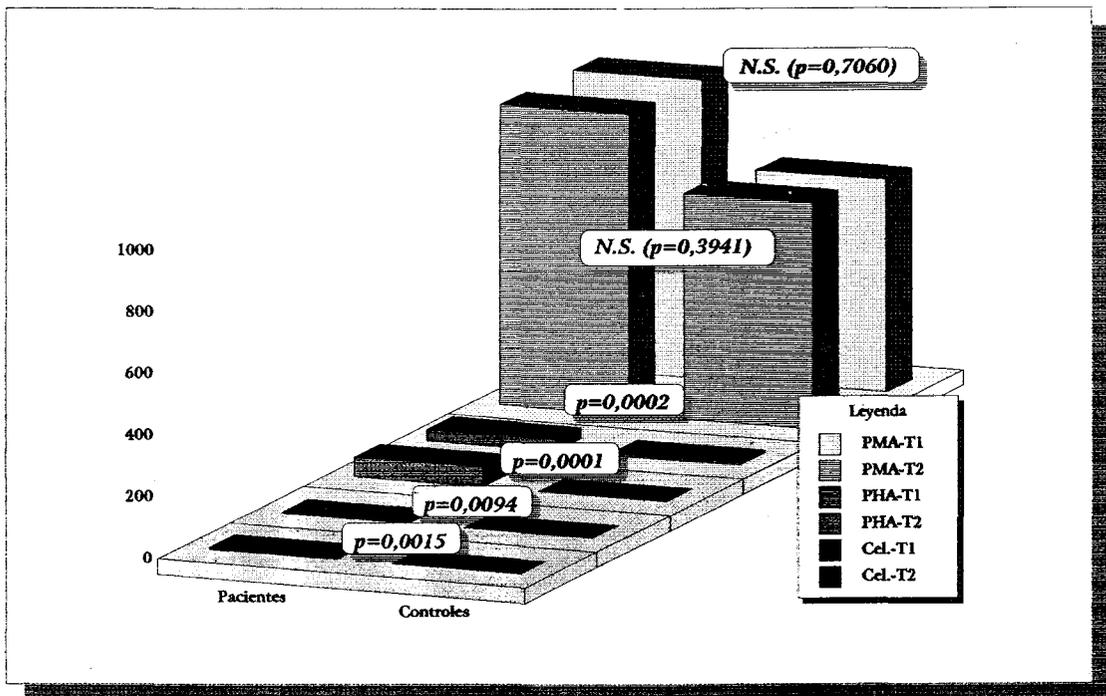


Figura 10. Comparación entre las concentraciones de IFN- γ (UI/ml) detectadas en los sobrenadantes a las 24 h. de cultivo, en el grupo de pacientes y en el grupo control.

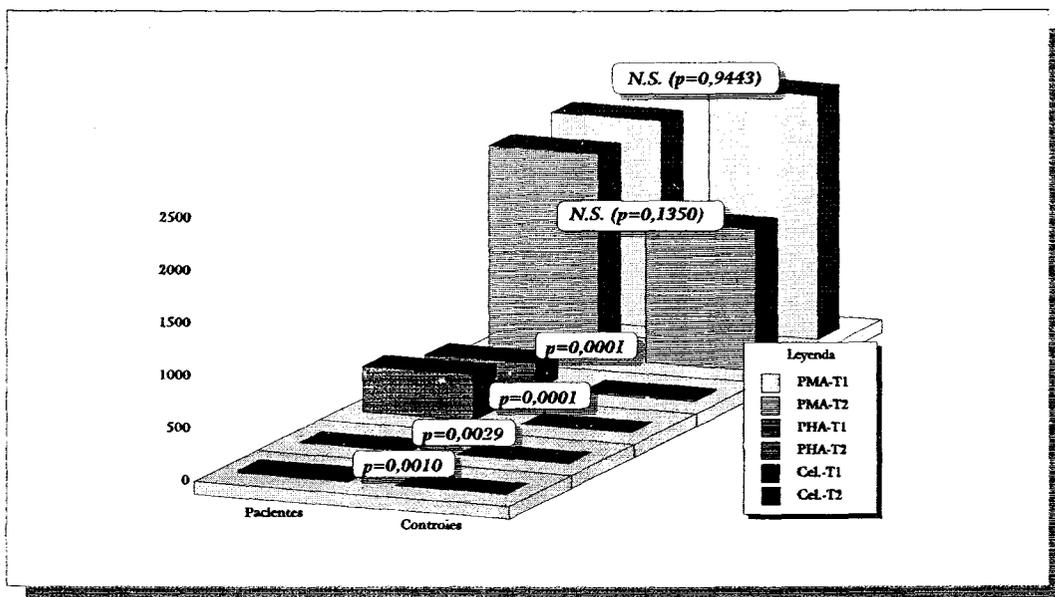


Figura 11. Comparación entre las concentraciones de IFN-γ (UI/ml) detectadas en los sobrenadantes a las 48 h. de cultivo, en los pacientes y en los controles.

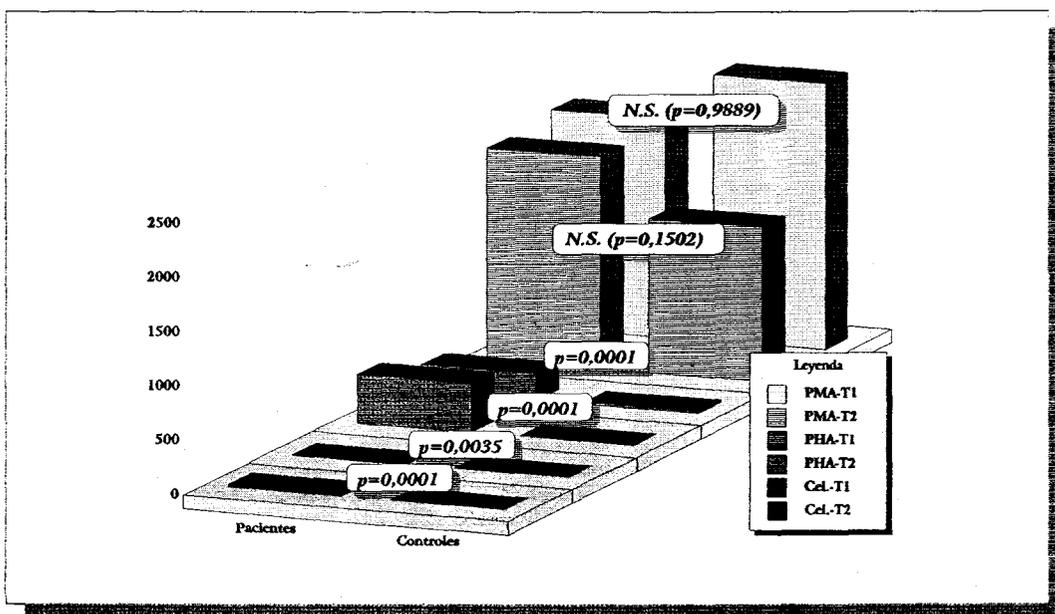


Figura 12. Comparación entre las concentraciones máximas de IFN-γ (UI/ml) detectadas en los sobrenadantes de los cultivos, en los pacientes y en los controles.

4.2. Interleuquina-4.

En lo que respecta a este mediador, la concentración detectada en los sobrenadantes a las 24 h. de cultivo, en el grupo de pacientes atópicos, aparecen detalladas en la *Tabla-8*.

- El valor medio de IL-4 en T1, para las células que no fueron estimuladas por mitógenos fueron de 1,44 pg/ml. (s.e.m. +/- 1,02). Por su parte, fuera de la época de síntomas, las PBMC no estimuladas presentaron en su sobrenadante concentraciones medias de 1,24 pg/ml. (s.e.m. +/- 0,74).
- Las células estimuladas con PHA presentaron concentraciones de IL-4 más altas que las anteriores, con una media de 36,4 pg/ml. (s.e.m. +/- 6,47) en T1, y de 20,0 pg/ml. (s.e.m. +/- 4,74) en T2. Al analizar esta diferencia desde el punto de vista estadístico, se comprobó que dicha diferencia era significativa ($p=0,0403$).
- En el caso de las células que fueron estimuladas con PMA más ionomicina, las concentraciones de IL-4 en los sobrenadantes de los cultivos

Pacientes	Cel.-T1	Cel.-T2	PHA-T1	PHA-T2	PMA-T1	PMA-T2
1	0,00	0,00	26,00	76,00	200,00	83,00
2	0,00	0,00	31,00	49,00	102,00	33,00
3	0,00	0,00	20,00	0,93	75,00	92,00
4	0,00	0,00	79,00	43,00	40,00	23,00
5	0,00	0,00	73,00	35,00	168,00	121,00
6	0,00	0,00	20,00	50,00	99,00	61,00
7	0,00	0,00	41,00	26,00	117,00	85,00
8	0,00	0,00	29,00	0,00	125,00	74,00
9	0,00	0,00	94,00	53,00	153,00	117,00
10	0,00	0,00	20,00	51,00	275,00	87,00
11	0,00	0,00	0,00	0,00	40,00	112,00
12	0,00	0,00	0,00	0,00	29,00	113,00
13	0,00	0,00	0,00	0,00	45,00	96,00
14	0,00	0,00	0,00	0,00	4,21	39,00
15	0,00	0,00	17,00	0,00	83,00	0,00
16	0,00	0,00	3,12	35,00	54,00	3,01
17	0,00	0,00	115,00	0,00	41,00	52,00
18	0,00	0,00	41,00	44,00	87,00	22,00
19	0,00	0,00	30,00	0,00	148,00	66,00
20	0,77	0,00	6,49	0,00	145,00	17,00
21	0,00	8,28	54,00	0,00	235,00	187,00
22	0,00	0,00	13,00	0,00	277,00	124,00
23	0,00	0,00	67,00	6,88	342,00	121,00
24	23,00	14,00	55,00	15,00	1005,00	253,00
25	12,00	9,86	76,00	15,00	73,00	47,00

Tabla 8. Concentración de IL-4 (pg/ml.) en los sobrenadantes a las 24h. de cultivo, en el grupo de pacientes polínicos.

mostraron valores medios de 158,48 pg/ml. (s.e.m. +/- 39,30) durante la época de polinización. Sin embargo, en T2, la concentración media detectada fue de 81,12 pg/ml. (s.e.m. +/- 11,54).

Como en el caso anterior, se pudo demostrar la significación estadística de esa diferencia ($p=0,0043$) (Figura-13).

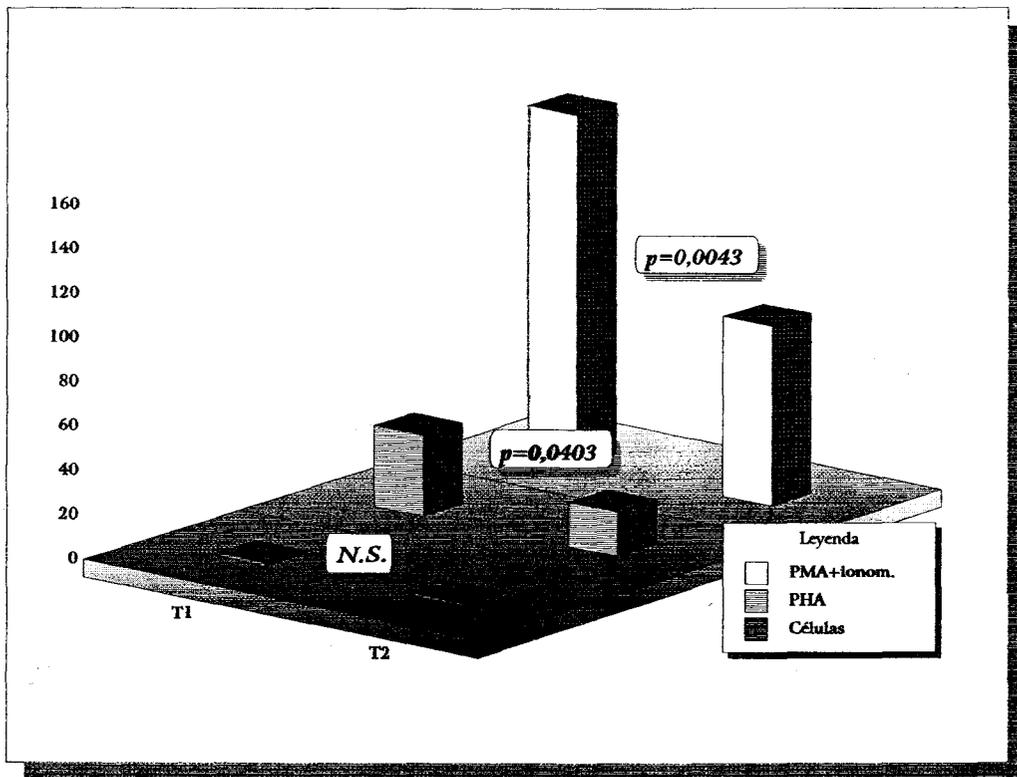


Figura 13. Comparación entre las medias de las concentraciones de IL-4 (pg/ml) detectadas en T1 y en T2, a las 24 h. de cultivo.

Del mismo modo, se analizaron los datos correspondientes al sobrenadante de los cultivos, una vez transcurridas 48 h. tras la estimulación con los mitógenos (*Tabla-9*).

► En el caso de las células no estimuladas, la concentración media de IL-4 fue de 0,28 pg/ml. (s.e.m. +/- 0,28) en T1, mientras que en T2 alcanzó valores medios de 0,76 pg/ml. (s.e.m. +/- 0,76). Como ocurría en el caso de las concentraciones detectadas a las 24 h. de cultivo para las células no estimuladas con mitógenos, no había suficientes determinaciones con valores distintos de 0 para poder llevar cabo un análisis estadístico de la diferencia existente entre T1 y T2.

► En lo que respecta a las células estimuladas con PHA, la media de las concentraciones de IL-4, en el T1, fue de 28,6 pg/ml. (s.e.m. +/- 5,94), mientras que en el T2 de 16,96 pg/ml. (s.e.m. +/- 3,96). Esta diferencia entre las medias no se mostró significativa tras su análisis estadístico ($p=0,0859$).

► Si atendemos a los valores obtenidos para las células cultivadas en presencia de PMA y de ionomicina, la media de las concentraciones detectadas en el T1 alcanzó los 100,36 pg/ml. (s.e.m.=15,68), mientras que en T2 fue de 71,24 pg/ml. (s.e.m.=10,62). La diferencia existente entre ambas series (T1 y T2) sí resultó ser estadísticamente significativa ($p=0,0238$).

Pacientes	Cel.-T1	Cel.-T2	PHA-T1	PHA-T2	PMA-T1	PMA-T2
1	0,00	0,00	35,00	63,00	176,00	87,00
2	0,00	0,00	24,00	41,00	62,00	34,00
3	0,00	0,00	13,00	2,95	67,00	80,00
4	0,00	0,00	40,00	14,00	31,00	20,00
5	0,00	0,00	41,00	24,00	145,00	90,00
6	0,00	0,00	5,87	13,00	42,00	44,00
7	0,00	0,00	41,00	20,00	133,00	55,00
8	0,00	0,00	12,00	0,00	84,00	71,00
9	0,00	0,00	33,00	22,00	124,00	121,00
10	0,00	0,00	19,00	47,00	161,00	61,00
11	0,00	0,00	0,00	2,89	23,00	128,00
12	0,00	0,00	0,00	0,00	12,00	99,00
13	0,00	0,00	0,00	0,00	35,00	163,00
14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,78	2,30
15	0,00	0,00	0,00	0,00	61,00	0,00
16	0,00	0,00	3,67	51,00	46,00	0,00
17	0,00	0,00	137,00	0,00	39,00	72,00
18	0,00	0,00	48,00	48,00	70,00	27,00
19	0,00	0,00	30,00	0,77	106,00	62,00
20	0,00	0,00	11,00	2,45	116,00	6,49
21	0,00	0,00	50,00	0,00	149,00	115,00
22	0,00	0,00	60,00	38,00	201,00	91,00
23	0,00	0,00	58,00	13,00	248,00	113,00
24	6,81	0,00	19,00	1,91	323,00	212,00
25	0,00	19,00	34,00	19,00	54,00	28,00

Tabla 9. Concentración de IL-4 (pg/ml.) en los sobrenadantes a las 48 h. de cultivo, en el grupo de pacientes polínicos.

Una representación gráfica de las concentraciones medias de IL-4 halladas a las 48 h. de cultivo, podemos observarla en la *Figura-14*.

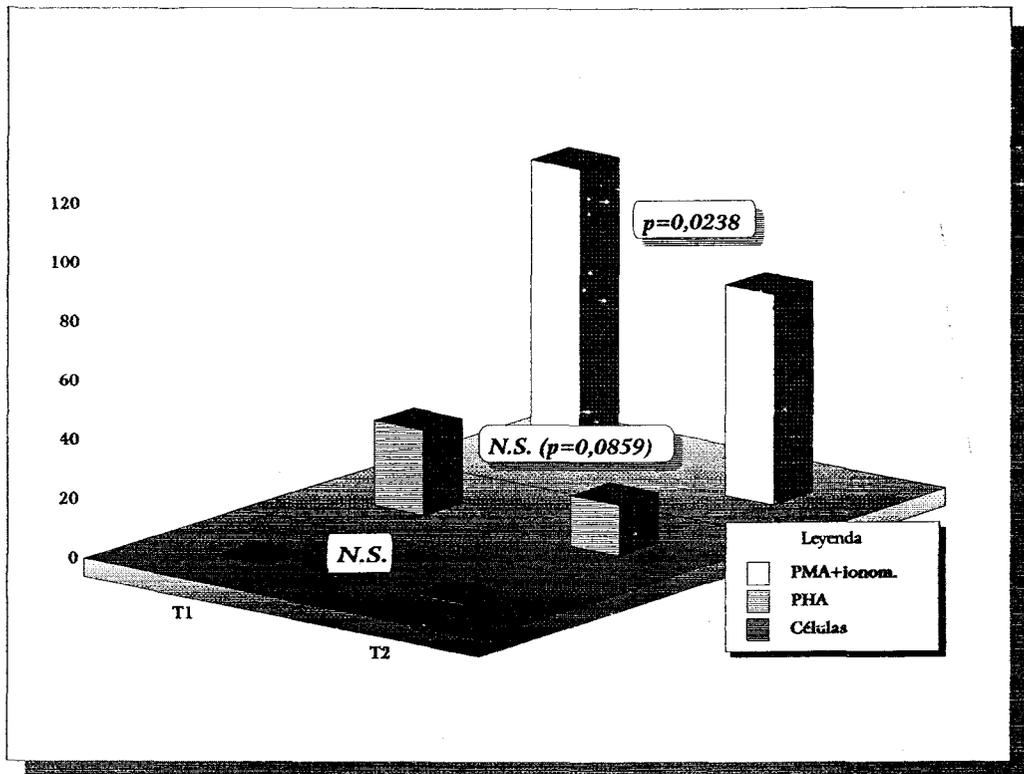


Figura 14. Comparación entre las medias de las concentraciones de IL-4 (pg/ml) detectadas en T1 y en T2, a las 48 h. de cultivo.

Como en el caso del IFN- γ , también quisimos hacer un análisis estadístico de los resultados obtenidos, considerando únicamente las concentraciones máximas de IL-4 alcanzadas en cada caso, sin tener en cuenta

si dichas concentraciones se alcanzaban a las 24 h. o a las 48 h. del cultivo. Esta perspectiva nos proporcionó una nueva serie de datos, algo diferente a las anteriores (*Tabla-10*).

- La media de las concentraciones máximas de IL-4 en el sobrenadante de las células no estimuladas, en el T1, fue de 1,44 pg/ml. (s.e.m.=1,02); mientras que, en T2, esa media fue de 1,28 pg/ml. (s.e.m.=0,73).

- En el caso de las células estimuladas con PHA, esta nueva orientación de los datos nos mostró una media de las concentraciones de IL-4, en el T1, de 34,84 pg/ml. (s.e.m.=6,93), y de 30,04 pg/ml. (s.e.m.=5,36) en el T2.

- Por su parte, los sobrenadantes de las células que se cultivaron en presencia de phorbol-éster más ionomicina, mostraron una concentración media de IL-4 de 159,12 pg/ml. (s.e.m.=39,28) en el T1, y de 85,8 pg/ml. (s.e.m.=11,97) en el T2.

Pacientes	Cel.-T1	Cel.-T2	PHA-T1	PHA-T2	PMA-T1	PMA-T2
1	0,00	0,00	35,00	76,00	200,00	87,00
2	0,00	0,00	31,00	49,00	102,00	34,00
3	0,00	0,00	20,00	2,95	75,00	92,00
4	0,00	0,00	79,00	43,00	40,00	23,00
5	0,00	0,00	73,00	35,00	168,00	121,00
6	0,00	0,00	20,00	50,00	99,00	61,00
7	0,00	0,00	41,00	26,00	133,00	85,00
8	0,00	0,00	29,00	0,00	125,00	74,00
9	0,00	0,00	94,00	53,00	153,00	121,00
10	0,00	0,00	20,00	51,00	275,00	87,00
11	0,00	0,00	0,00	2,89	40,00	128,00
12	0,00	0,00	0,00	0,00	29,00	113,00
13	0,00	0,00	0,00	0,00	45,00	163,00
14	0,00	0,00	0,00	0,00	4,21	39,00
15	0,00	0,00	17,00	0,00	83,00	0,00
16	0,00	0,00	3,67	51,00	54,00	3,01
17	0,00	0,00	137,00	0,00	41,00	72,00
18	0,00	0,00	48,00	48,00	87,00	27,00
19	0,00	0,00	30,00	0,77	148,00	66,00
20	0,77	0,00	11,00	2,45	145,00	17,00
21	0,00	8,28	54,00	0,00	235,00	187,00
22	0,00	0,00	60,00	38,00	277,00	124,00
23	0,00	0,00	67,00	13,00	342,00	121,00
24	23,00	14,00	55,00	15,00	1005,00	253,00
25	12,00	9,86	76,00	19,00	73,00	47,00

Tabla 10. Concentración máxima de IL-4 (pg/ml.) detectada en los sobrenadantes de los cultivos, en el grupo de pacientes polínicos.

► Al realizar el tratamiento estadístico de esa nueva serie de datos, pudimos observar que la diferencia existente entre las concentraciones máximas detectadas de IL-4 en el T1 y en el T2 (Figura-15), era estadísticamente significativa en el caso de las concentraciones obtenidas tras la estimulación con PMA más ionomicina ($p=0,0098$), pero no en el caso de las células no estimuladas ($p=0,1007$), ni en el de las células cultivadas en presencia de PHA ($p=0,9584$).

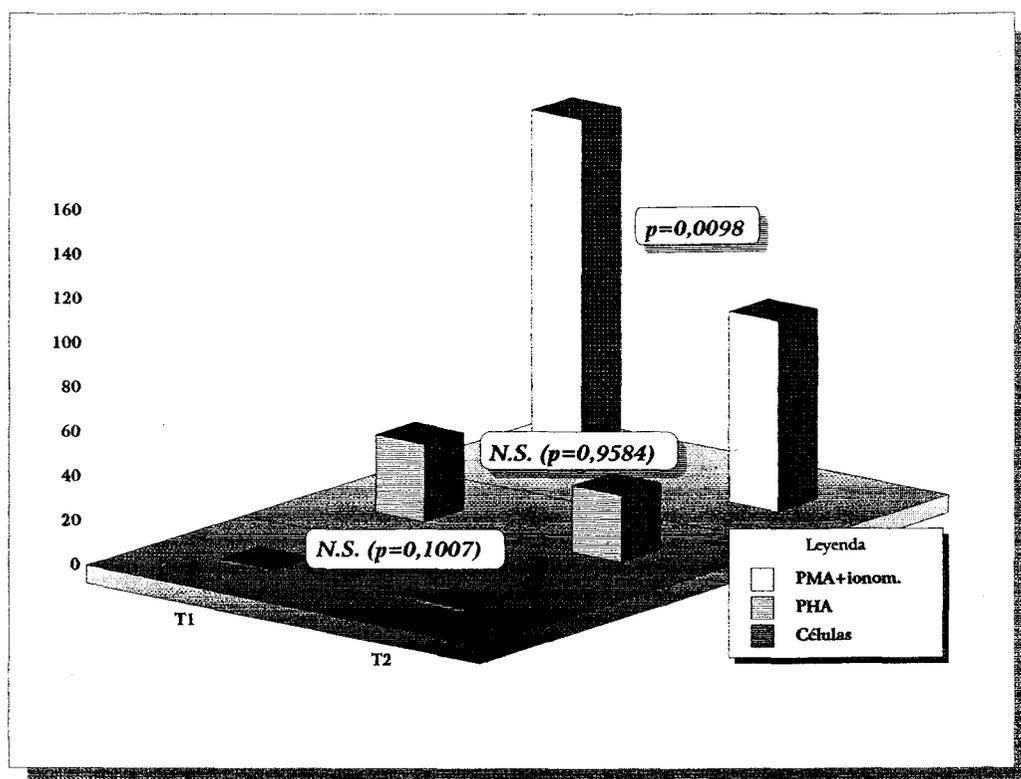


Figura 15. Comparación entre las medias de las concentraciones máximas de IL-4 (pg/ml) detectadas en T1 y en T2, en los cultivos del grupo de pacientes polínicos.

Como expusimos anteriormente en los resultados referidos al IFN- γ , quisimos comprobar si la diferencia que aparecía en los pacientes atópicos sin inmunoterapia se ponía también de manifiesto en aquellos que recibían tratamiento con inmunoterapia. Por ello, determinamos la concentración de IL-4 que había en los sobrenadantes de las células cultivadas en presencia de PMA e ionomicina, a las 24 h. de cultivo (*Tabla-11*).

<i>Pacientes</i>	<i>PMA-T1</i>	<i>PMA-T2</i>
1	87,50	107,00
2	196,00	141,00
3	178,00	136,00
4	4,90	45,00
5	97,00	81,00
6	92,00	56,00
7	170,00	112,00
8	213,00	181,00

Tabla 11. Concentración de IL-4 (pg/ml.) detectada a las 24 h. en los sobrenadantes de los cultivos, en el grupo de pacientes atópicos con inmunoterapia.

En este caso, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre T1 y T2 ($p > 0,05$), al contrario de lo que vimos anteriormente que ocurría en los pacientes atópicos sin inmunoterapia.

Los valores de IL-4 obtenidos a partir de los sobrenadantes de los cultivos en el grupo control fueron sometidos al mismo ordenamiento y al mismo tratamiento estadístico que en el grupo de pacientes atópicos.

► Los valores a las 24 h. del cultivo se muestran en la *Tabla-12*. En este caso, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores del T1 y los del T2 (*Figura-16*), ni en las células cultivadas en presencia de PHA ($p=0,1380$), ni en las que lo fueron en presencia de PMA e ionomicina ($p=0,1728$).

Controles	Cel.-T1	Cel.-T2	PHA-T1	PHA-T2	PMA-T1	PMA-T2
1	0,00	0,00	40,00	0,00	119,00	22,00
2	0,00	0,00	33,00	0,00	114,00	55,00
3	0,00	0,00	18,00	22,00	79,00	126,00
4	0,00	0,00	3,37	0,00	13,00	50,00
5	0,00	0,00	9,80	0,00	116,00	50,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00	182,00	170,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00	158,00	162,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00	57,00	58,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	73,00	23,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00	126,00	67,00
11	0,00	0,00	0,00	0,00	160,00	126,00
12	0,00	0,00	0,00	0,00	161,00	170,00
13	0,00	0,00	0,00	0,00	141,00	126,00
14	0,00	0,00	0,00	0,00	110,00	120,00
15	0,00	0,00	0,00	0,00	125,00	142,00

Tabla 12. Concentración detectada de IL-4 (pg/ml.) a las 24 h. en los sobrenadantes de los cultivos, en el grupo control.

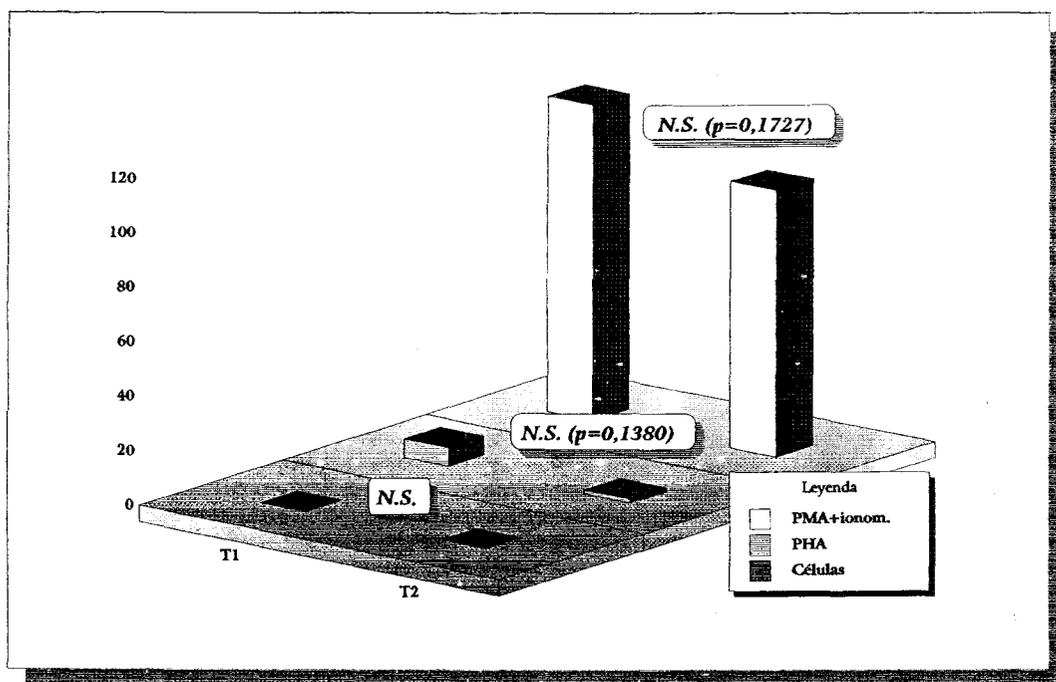


Figura 16. Comparación entre las concentraciones de IL-4 (pg/ml) detectadas en T1 y en T2, a las 24 h. de cultivo, en el grupo control.

► Las concentraciones de IL-4 que se detectaron en este grupo al cabo de 48 h. de cultivo (*Tabla-13*), tampoco mostraron diferencias con significación estadística entre el T1 y el T2 (*Figura-17*), siendo $p=0,4652$ en el caso de células estimuladas con PHA, y $p=0,7332$ en el de las estimuladas con PMA más ionomicina.

En las células no estimuladas con mitógenos, tanto a las 24 h. como a las 48 h. de cultivo, no se detectaron suficientes valores distintos de 0, como para permitir el análisis estadístico de las diferencias.

Controles	Cel.-T1	Cel.-T2	PHA-T1	PHA-T2	PMA-T1	PMA-T2
1	0,00	0,00	3,37	0,00	99,00	25,00
2	0,00	0,00	43,00	0,00	76,00	42,00
3	0,00	0,00	8,20	29,00	56,00	94,00
4	0,00	0,00	2,45	0,00	10,00	41,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00	82,00	41,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00	120,00	158,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00	145,00	170,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00	56,00	62,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	55,00	21,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00	133,00	74,00
11	0,00	0,00	0,00	0,00	117,00	122,00
12	0,00	0,00	0,00	0,00	160,00	193,00
13	0,00	0,00	0,00	0,00	119,00	102,00
14	0,00	0,00	0,00	0,00	118,00	132,00
15	0,00	0,00	0,00	0,00	140,00	153,00

Tabla 13. Concentración detectada de IL-4 (pg/ml.) a las 48 h. en los sobrenadantes de los cultivos, en el grupo control.

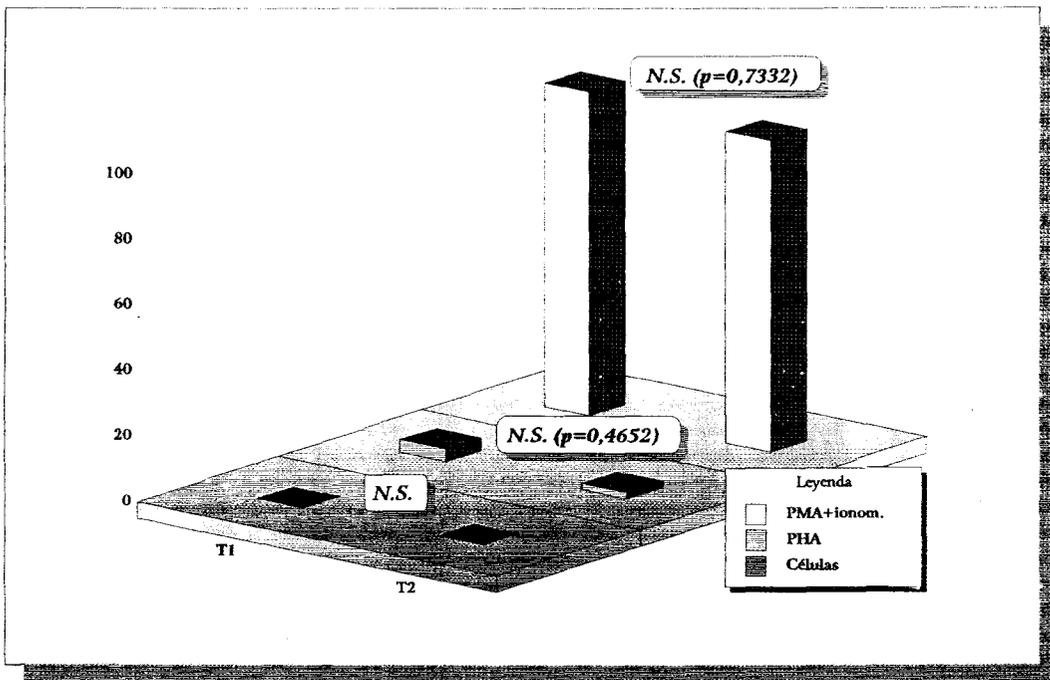


Figura 17. Comparación entre las concentraciones de IL-4 (pg/ml) detectadas en T1 y en T2, a las 48 h. de cultivo, en el grupo control.

► En lo que respecta a los valores máximos de IL-4 detectados en el grupo de individuos sanos (*Tabla-14*), la comparación entre las concentraciones obtenidas en el T1 y en el T2, no mostraron diferencias con significación estadística, ni en el caso de las células estimuladas con PHA ($p=0,2249$), ni en de las que lo fueron con PMA más ionomicina ($p=0,2219$) (*Figura 18*).

En cuanto a las células que no fueron estimuladas por la acción de los mitógenos, no había suficientes determinaciones distintas de 0 para permitir el tratamiento estadístico de la posible diferencia.

Controles	Cel.-T1	Cel.-T2	PHA-T1	PHA-T2	PMA-T1	PMA-T2
1	0,00	0,00	40,00	0,00	119,00	25,00
2	0,00	0,00	43,00	0,00	114,00	55,00
3	0,00	0,00	18,00	29,00	79,00	126,00
4	0,00	0,00	3,37	0,00	13,00	50,00
5	0,00	0,00	9,80	0,00	116,00	50,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00	182,00	170,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00	158,00	170,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00	57,00	62,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	73,00	23,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00	133,00	74,00
11	0,00	0,00	0,00	0,00	160,00	126,00
12	0,00	0,00	0,00	0,00	161,00	193,00
13	0,00	0,00	0,00	0,00	141,00	126,00
14	0,00	0,00	0,00	0,00	118,00	132,00
15	0,00	0,00	0,00	0,00	140,00	153,00

Tabla 14. Concentración máxima de IL-4 (pg/ml.) detectada en los sobrenadantes de los cultivos, en el grupo control.

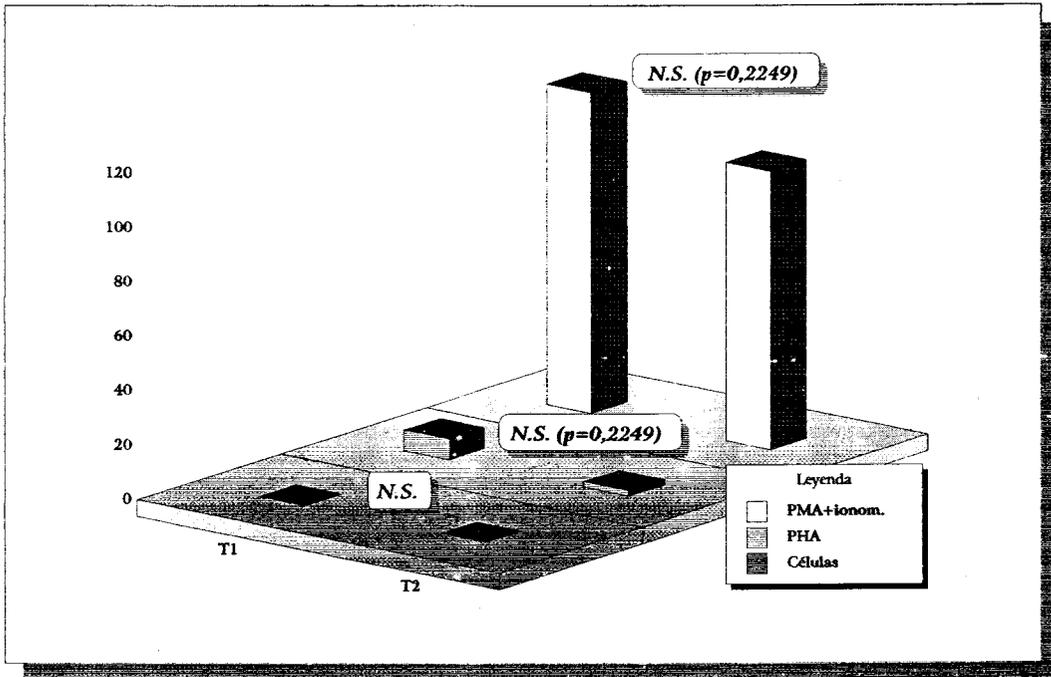


Figura 18. Comparación entre las concentraciones máximas de IL-4 (pg/ml) detectadas en T1 y en T2, en el grupo control.

Finalmente, quisimos comprobar la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas entre los valores de IL-4 obtenidos en el grupo de pacientes atópicos y los obtenidos en el grupo control, en cada serie de datos (*Figuras-18, 19 y 20*).

► De esta forma, pudimos observar que no había diferencias con significación estadística ($p > 0,05$), entre pacientes y controles, en los casos de las células no estimuladas con mitógenos. Esto era así, ya fueran

determinaciones llevadas a cabo a las 24 h. de cultivo, a las 48 h. del mismo, o fueran los valores máximos detectados, tanto en el T1 como en el T2.

► Por el contrario, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas, al comparar las concentraciones de IL-4 en pacientes y controles, detectadas en los sobrenadantes de las células estimuladas con PHA, tanto a las 24 h. del cultivo (T1, $p=0,0007$; T2, $p=0,0022$), como a las 48 h. (T1, $p=0,0004$); T2, $p=0,0003$), o al considerar únicamente las concentraciones máximas (T1, $p=0,002$; T2, $p=0,0001$).

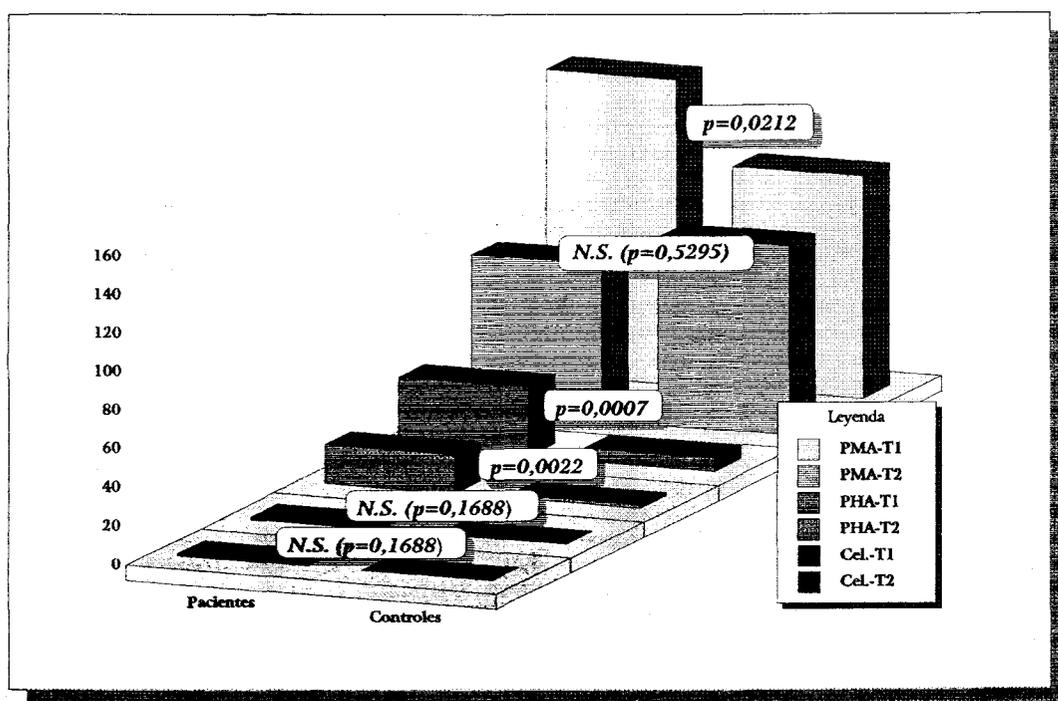


Figura 19. Comparación entre las concentraciones de IL-4 (pg/ml) detectadas a las 24h. de cultivo, en el grupo de pacientes y en el grupo control.

► Los resultados de esta comparación entre el grupo de pacientes y el grupo control, para los datos correspondientes a las células estimuladas con PMA más ionomicina, mostraron diferencias con significación estadística en los datos obtenidos a las 24 h. en el T1 ($p=0,0212$), pero no en el T2 ($p=0,5296$). Tampoco hubo diferencia significativa, desde el punto de vista estadístico, en los valores obtenidos a las 48 h. del cultivo, tanto en el T1 ($p=0,0521$) como en el T2 ($p=0,9221$), ni en los correspondientes a los valores máximos detectados (T1, $p=0,0556$; T2, $p=0,5573$).

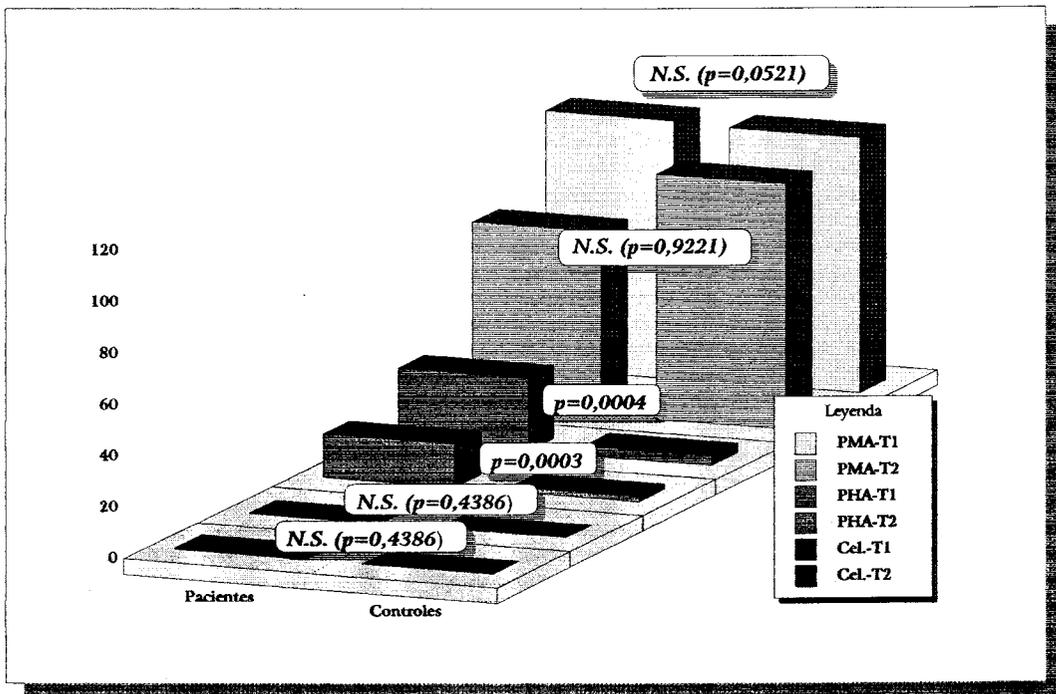


Figura 20. Comparación entre las concentraciones de IL-4 (pg/ml) detectadas a las 48h. de cultivo, en el grupo de pacientes y en el grupo control.

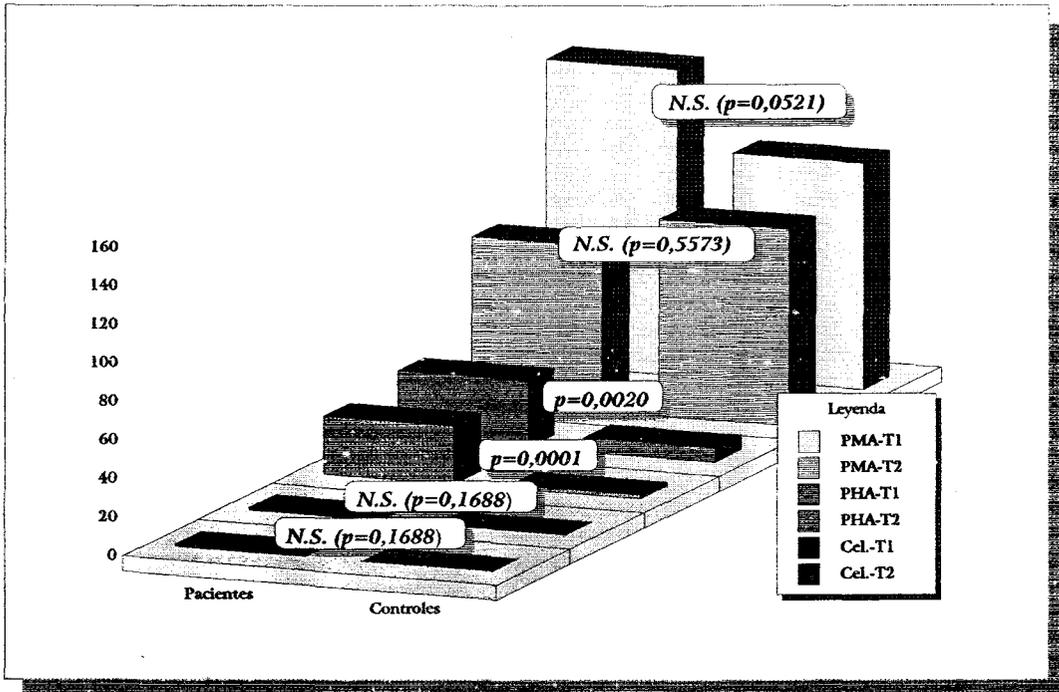


Figura 21. Comparación entre las concentraciones máximas de IL-4 (pg/ml) detectadas en los sobrenadantes de los cultivos, en el grupo de pacientes y en el grupo control.

4.3. Interleuquina-5.

Finalmente, llevamos a cabo la determinación de las concentraciones de IL-5 en el sobrenadante de los cultivos, tanto en pacientes como en controles, a las 48 h. de su estimulación con los mitógenos correspondientes. Los valores obtenidos figuran detallados en la *Tabla-15*.

► En lo que concierne al grupo de pacientes atópicos sin inmunoterapia, la concentración de IL-5 en las células que dejamos sin estimular por mitógenos alcanzó un valor medio de 1,08 pg/ml. (s.e.m. +/- 0,46) en el T1, mientras que en el T2 la concentración media fue de 0,32 pg/ml. (s.e.m. +/- 0,25).

Desde el punto de vista estadístico, esa diferencia entre las concentraciones medias de ambos tiempos se mostró como no significativa ($p=0,1041$) (*Figura-22*).

► Las concentraciones de IL-5 detectadas en los sobrenadantes de las células cultivadas en presencia de PHA, tuvieron en el T1 una media de 65,76 pg/ml. (s.e.m. +/- 12,34); mientras que en el T2 esa media fue de 45,60 pg/ml. (s.e.m. +/- 10,29).

Pacientes	Cel.-T1	Cel.-T2	PHA-T1	PHA-T2	PMA-T1	PMA-T2
1	0,00	0,00	95,00	80,00	107,00	0,00
2	5,68	0,00	66,00	7,43	99,00	11,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00	18,00	38,00
4	0,00	0,00	169,00	61,00	123,00	32,00
5	0,47	0,14	209,00	140,00	472,00	128,00
6	7,76	0,00	91,00	25,00	146,00	23,00
7	0,00	0,00	95,00	72,00	47,00	22,00
8	3,25	5,61	0,82	176,00	88,00	398,00
9	0,00	0,00	44,00	72,00	54,00	53,00
10	4,64	2,22	86,00	6,39	90,00	25,00
11	0,13	0,00	66,00	0,00	40,00	57,00
12	0,00	0,00	23,00	1,18	36,00	185,00
13	0,00	0,00	2,90	6,09	44,00	43,00
14	0,00	0,00	0,00	13,00	16,00	0,00
15	0,47	0,00	3,59	82,00	106,00	0,00
16	0,00	0,00	0,00	48,00	84,00	0,00
17	0,00	0,00	201,00	158,00	19,00	8,47
18	0,00	0,00	90,00	61,00	22,00	0,00
19	0,00	0,00	3,56	11,00	14,00	25,00
20	0,00	0,00	99,00	37,00	33,00	14,00
21	5,40	0,00	68,00	0,00	87,00	124,00
22	0,00	0,00	111,00	62,00	367,00	269,00
23	0,00	0,00	58,00	22,00	206,00	112,00
24	0,00	0,00	61,00	0,00	205,00	17,00
25	0,00	0,00	0,00	0,00	60,00	3,69

Tabla 15. Concentración de IL-5 (pg/ml.) detectada a las 48 h. en los sobrenadantes de los cultivos, en el grupo de pacientes polínicos.

► En el caso de las células estimuladas con PMA e ionomicina, la concentración media de IL-5 en el T1 fue de 103,32 pg/ml. (s.e.m. +/- 22,01); en el T2, la media alcanzó valores de 63,52 pg/ml. (s.e.m. +/- 19,22).

Al analizar la posible significación estadística de esas diferencias (Figura-22), encontramos que, tanto en el caso de la estimulación con PHA, como en la estimulación por PMA más ionomicina, la diferencia entre las concentraciones en el T1 y en el T2, se mostraron como estadísticamente significativas (PHA, $p=0,0288$; PMA, $p=0,0057$).

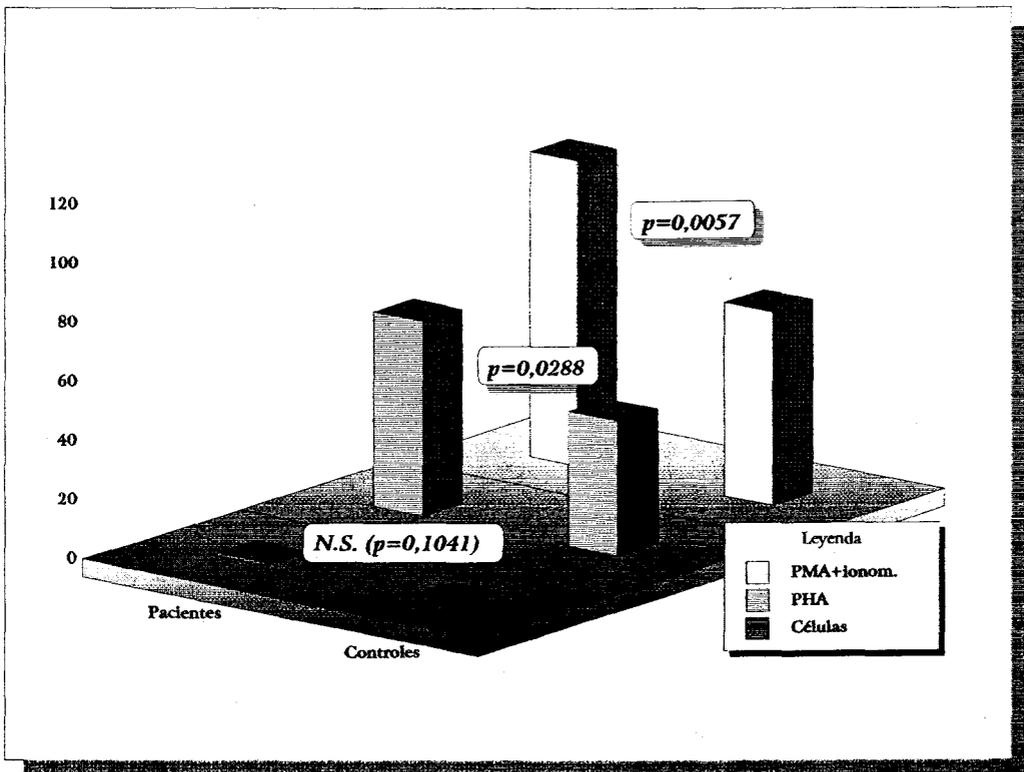


Figura 22. Comparación entre las medias de las concentraciones de IL-5 (pg/ml) detectadas a las 48 h. en T1 y en T2, en los pacientes sin inmunoterapia.

Como en las citoquinas anteriores, utilizamos los cultivos del grupo de pacientes atópicos que recibían inmunoterapia para comprobar si se daban las mismas diferencias observadas en los pacientes sin tratamiento inmunoterápico.

► En ese sentido, determinamos las concentraciones de IL-5 en los cultivos estimulados con PMA más ionomicina (*Tabla-16*).

La media alcanzada en T1 fue de 279,50 pg/ml (s.e.m. +/- 124,506), mientras que la de T2 fue de 135,90 pg/ml (s.e.m. +/- 36,26).

<i>Pacientes</i>	<i>PMA-T1</i>	<i>PMA-T2</i>
1	42,00	89,00
2	1.109,00	278,00
3	94,00	125,00
4	95,00	2,00
5	108,00	3,20
6	174,00	150,00
7	388,00	245,00
8	226,00	195,00

Tabla 16. Concentración de IL-5 (pg/ml.) detectada a las 48 h. en los sobrenadantes de los cultivos, en el grupo control.

► El tratamiento estadístico nos mostró que la diferencia existente entre ambas series no era lo suficientemente grande como para excluir que se sólo se deba al azar ($p > 0.05$).

La misma sistemática que con los pacientes sin inmunoterapia, se llevó a cabo con los datos obtenidos de los cultivos celulares del grupo control (*Tabla-17*).

► En dicho grupo, la media de las concentraciones en el T1 de las células sin estimular fue de 1,40 pg/ml. (s.e.m. +/- 1,01), siendo en el T2 de 2,60 pg/ml. (s.e.m. +/- 1,33).

► Los cálculos correspondientes a las células estimuladas con PHA, mostraron una concentración media de IL-5, en el T1, de 3,60 pg/ml. (s.e.m. +/- 2,14), y de 8,27 pg/ml. (s.e.m. +/- 5,09) en el T2.

► En cuanto a las células que fueron cultivadas en presencia de PMA más ionomicina, las concentraciones de IL-5, en el T1, presentaron un valor medio de 85,93 pg/ml. (s.e.m. +/- 14,60); en el T2, esa concentración media fue de 107,27 pg/ml. (s.e.m. +/- 14,49).

Controles	Cel.-T1	Cel.-T2	PHA-T1	PHA-T2	PMA-T1	PMA-T2
1	15,00	0,00	30,00	0,00	145,00	0,00
2	14,00	0,00	71,00	6,90	186,00	54,00
3	5,39	0,00	23,00	0,00	7,67	25,00
4	4,64	6,90	0,00	23,00	22,00	78,00
5	0,00	14,00	0,00	24,00	41,00	60,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00	158,00	175,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00	153,00	170,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00	63,00	14,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	81,00	57,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00	109,00	97,00
11	0,00	0,00	0,00	0,00	172,00	174,00
12	0,00	0,00	0,00	0,00	75,00	54,00
13	0,00	0,00	0,00	0,00	143,00	123,00
14	0,00	0,00	0,00	0,00	112,00	106,00
15	0,00	0,00	0,00	0,00	141,00	102,00

Tabla 17. Concentración de IL-5 (pg/ml.) detectada a las 48 h. en los sobrenadantes de los cultivos, en el grupo control.

► Como en casos anteriores, quisimos determinar la posible significación estadística de las diferencias existentes entre los valores de T1 y los de T2 (*Figura-23*).

De esta forma, pudimos comprobar que el grupo control no presentaba concentraciones de IL-5 estadísticamente diferentes entre el T1

y el T2; y esto era así, tanto para las células no estimuladas ($p=0,4164$), como para las que lo fueron con PHA ($p=0,4164$), o las que se cultivaron en presencia de PMA más ionomicina ($p=0,1725$).

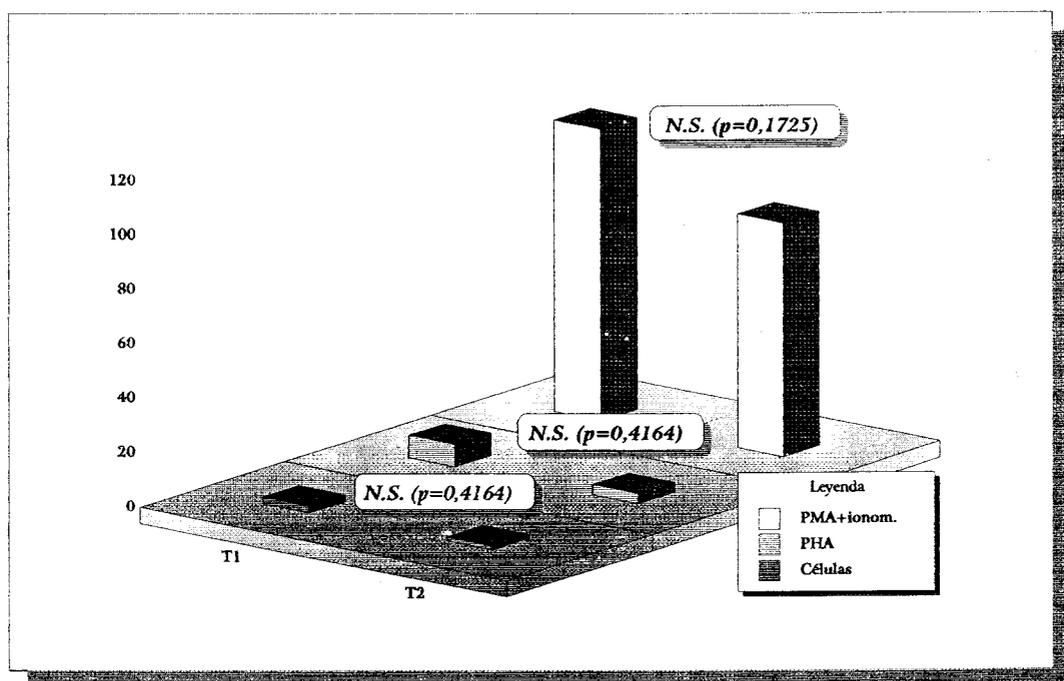


Figura 23. Comparación entre las medias de las concentraciones de IL-5 (pg/ml) detectadas a las 48 h. en T1 y en T2, en el grupo control.

Finalmente, para completar el análisis estadístico de los datos obtenidos sobre la secreción de IL-5, comparamos los valores correspondientes del grupo de pacientes atópicos con los del grupo control (Figura-24).

- En este punto, no se observaron diferencias estadísticamente significativas al considerar los valores obtenidos para las células no estimuladas, ya fuera en el T1 ($p=0,5197$) o en el T2 ($p=0,5281$).
- En las que se cultivaron en presencia de PHA, las diferencias sí se mostraron con significación estadística, tanto en el T1 ($p=0,0003$) como en el T2 ($p=0,0002$).
- Respecto a las que se estimularon con PMA más ionomicina, la diferencia sí se mostró significativa, desde el punto de vista estadístico, en el T1 ($p=0,0439$), pero no así en el T2 ($p=0,2296$).

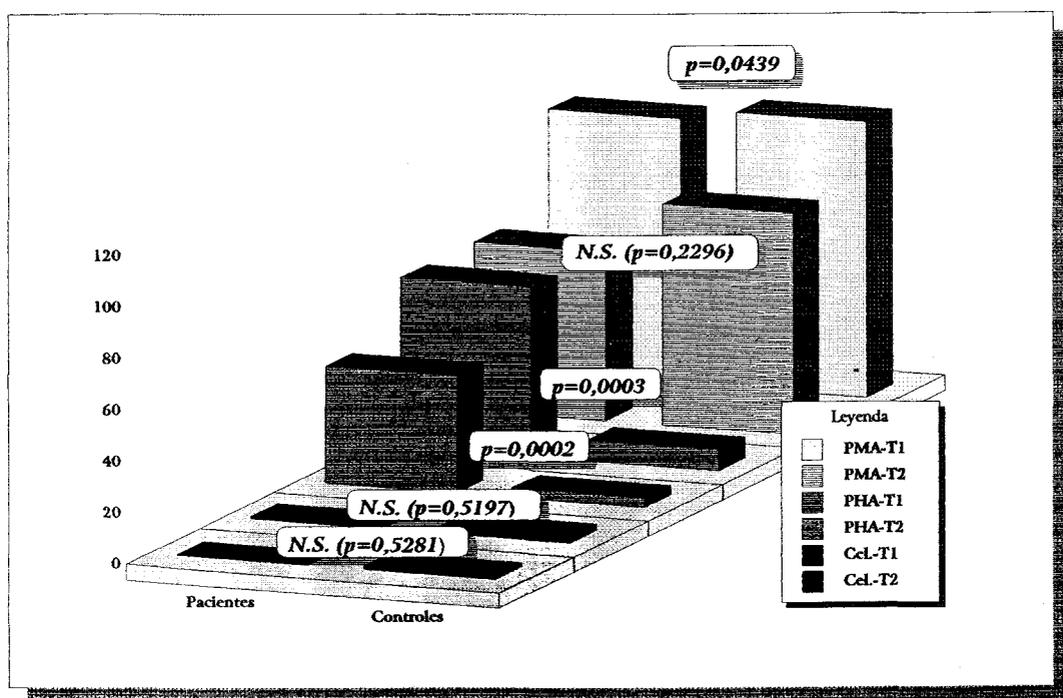


Figura 24. Comparación entre las concentraciones de IL-5 (pg/ml) detectadas en los sobrenadantes a las 48 h. de cultivo, en el grupo de pacientes y en el grupo control.

4.4. Análisis de correlación entre las variables.

Para valorar la existencia de factores comunes que incidieran sobre la secreción de IL-5 e IL-4, estudiamos la posible correlación existente entre los datos obtenidos para ambas interleuquinas en el grupo de pacientes atópicos.

Dado que en el caso de la IL-5 sólo disponíamos de sus concentraciones a las 48 h. del cultivo y estimulación de las células, se aplicó el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman, tanto entre la IL-5 con respecto a la IL-4 determinada a las 24 h., como de aquella con respecto a la IL-4 que se objetivó a las 48 h. del cultivo.

► En el primer caso (IL-5 a las 48 h., frente a IL-4 a las 24 h.), sólo apareció una correlación positiva débil ($\rho=0,474$), pero significativa desde el punto de vista estadístico ($p=0,0203$), en los valores obtenidos a partir de los cultivos de células estimuladas con PHA, durante T1 (Figura-25). No fue así para el T2 con ese mismo mitógeno, ni en los casos de estimulación con PMA más ionomicina, o de las células cultivadas en ausencia de mitógenos ($p>0,05$).

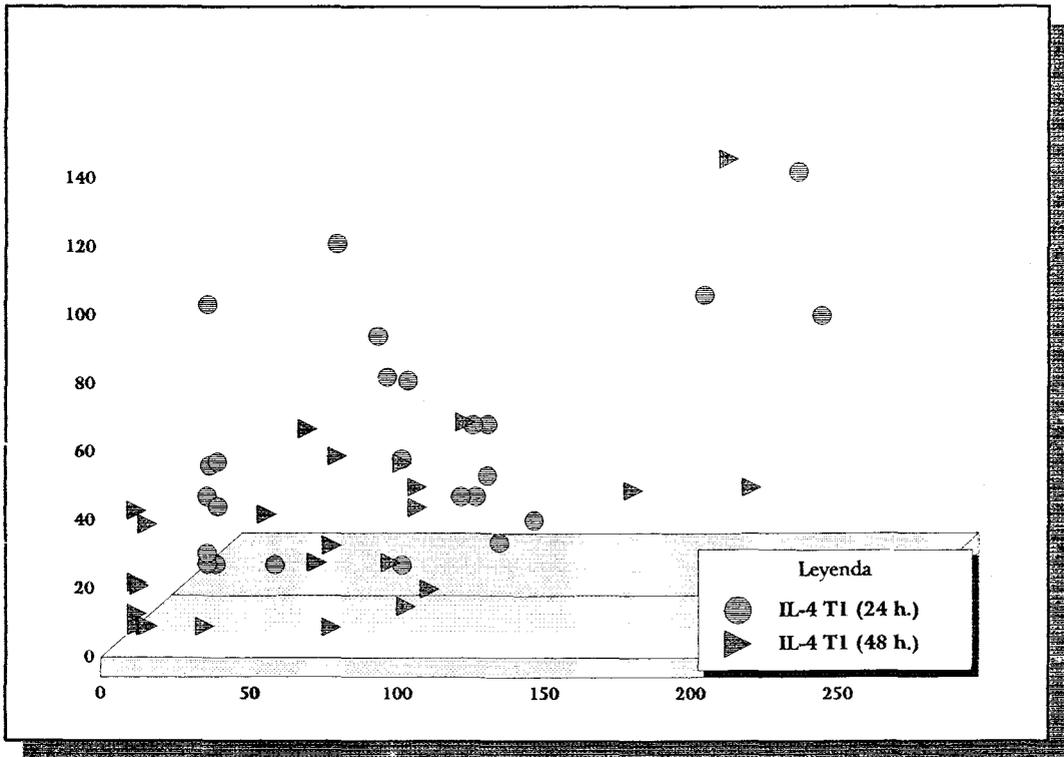


Figura 25. Correlación entre las concentraciones de IL-5 y las de IL-4 en T1, en el grupo de pacientes polínicos.

► En el segundo caso, comparando los valores de ambas variables obtenidos a las 48 h. de cultivo, tampoco se observó una correlación estadísticamente significativa entre las concentraciones aparecidas cuando utilizábamos la estimulación con PMA. No obstante, sí se mostró con significación estadística ($p=0,0048$) la correlación positiva ($p=0,576$) que apareció entre las concentraciones detectadas cuando las células eran cultivadas en presencia de PHA en el T1 (Figura-25).

► Los resultados anteriores son similares a los que obteníamos si comparábamos los valores de IL-5 con los valores máximos de IL-4, ya fueran a las 24 h. o a las 48 h. del cultivo. De esta forma, sólo aparecía una correlación positiva ($\rho=0,429$), estadísticamente significativa ($p=0,0357$), entre las concentraciones de IL-5 y de IL-4 de células estimuladas con PHA, en el T1.

5. DISCUSIÓN

Ya hemos expuesto, a lo largo de la introducción de este trabajo, las peculiaridades que presenta la respuesta inmune de los individuos atópicos, los cuales se encuentran genéticamente predeterminados hacia la sensibilización frente a uno o más epítopes determinados.

Recordemos que esa respuesta, basada fundamentalmente en la secreción de IgE, presenta un carácter francamente heterogéneo ⁽⁴⁶⁻⁵⁴⁾. Dicha variabilidad se manifiesta tanto en la clínica que exhiben los pacientes, como en la respuesta a nivel celular, presentando las células de su sistema inmune diferencias en cuanto a su capacidad para la secreción de citoquinas.

Sin embargo, a pesar de esa heterogeneidad, los individuos alérgicos presentan peculiaridades en su sistema de respuesta inmunológica que los hacen distinguibles de los sujetos sanos.

Aunque algunos autores ⁽²³⁾ consideran que, en los pacientes atópicos, no existe una correlación significativa entre la síntesis de IgE y el balance existente entre las secreciones de IL-4 y de IFN- γ , parece suficientemente probado el papel regulador primordial que estas citoquinas desempeñan en dicha síntesis ⁽¹⁻¹²⁾.

Igualmente, diversos autores han puesto de manifiesto que las células T de los sujetos atópicos experimentan de forma preferente una diferenciación hacia el fenotipo Th2 de secreción de linfoquinas, en respuesta a diversos antígenos ^(63-65, 67, 68).

En nuestro estudio hemos querido estudiar esa diferente capacidad de los individuos atópicos para segregar citoquinas. En este sentido, queremos destacar la significación estadística de las diferencias encontradas al comparar las concentraciones de las diferentes citoquinas, entre el grupo de pacientes atópicos sin inmunoterapia y el grupo de voluntarios sanos.

En esta primera aproximación a los resultados valoramos las diferencias entre los dos grupos de población seleccionados y no las que pudiera haber en cada uno de ellos entre T1 y T2.

Los resultados obtenidos presentan, a nuestro juicio, varios puntos destacables. Por un lado, vemos que la concentración de IL-4 encontrada en el sobrenadante de las células no estimuladas no se diferenciaba de forma significativa entre pacientes atópicos y controles sanos.

Sin embargo, la diferencia sí se hacía estadísticamente significativa al comparar los resultados obtenidos tras la estimulación con PHA, en cualquiera de las determinaciones.

Por su parte, las diferencias encontradas tras la estimulación con PMA e ionomicina mostraban una significación estadística menos uniforme. En el T1 la diferencia fue estadísticamente significativa en las muestras recogidas a las 24 h. de cultivo, y no alcanzó la significación estadística al comparar los valores obtenidos a las 48 h. de cultivo, al igual que ocurrió considerando los valores máximos detectados entre las 24 h. y las 48 h..

Sin embargo, en las células estimuladas con PMA más ionomicina, nunca hubo significación estadística en las diferencias entre pacientes y controles en las concentraciones de IL-4 detectadas en T2.

En lo que respecta a las concentraciones de IL-5, vemos un comportamiento de los resultados semejante al que hemos comentado para la IL-4, en cuanto a la comparación entre los valores del grupo de pacientes y del grupo control. Es decir, no aparecieron diferencias significativas si atendemos a las PMBC no estimuladas con mitógenos, pero sí hubo significación estadística en las diferencias, cuando las células habían sido cultivadas en presencia de PHA, tanto en el T1 como en el T2. Mientras tanto, tras la estimulación con PMA más ionomicina, sólo fue significativa en T1 .



Este comportamiento similar en la secreción de IL-4 y de IL-5, como era de esperar, nos sugiere una interrelación en la secreción de ambas citoquinas, al menos en los sujetos atópicos.

Si nos fijamos en los resultados correspondientes al IFN- γ , aparecen diferencias estadísticamente significativas en casos distintos a los reseñados anteriormente para la IL-4 y de la IL-5.

Concretamente, aparecieron diferencias con significación estadística en las PMBC no estimuladas con mitógenos y en las estimuladas con PHA, tanto en T1 como en T2.

Sin embargo, las células cultivadas en presencia de PMA más ionomicina, no presentaron diferencias significativas, desde el punto de vista estadístico, en ningún caso.

Los resultados más sorprendentes son los que nos muestran niveles de secreción de IFN- γ más altos en pacientes atópicos que en sujetos sanos, en contradicción con otros trabajos publicados anteriormente ^(3, 60).

Un reciente estudio de Ewan *et al* ⁽¹⁵⁸⁾, señala que los pacientes atópicos muestran un defecto generalizado en la producción de IFN- γ , no relacionado con la respuesta al alérgeno.

Nosotros, en este estudio, no hemos podido poner de manifiesto ese defecto de producción, si bien tanto las células no estimuladas como aquellas que lo fueron con PHA mostraron niveles bajos de secreción de IFN- γ . Este hecho, aunque necesitaría una adecuada comprobación, podría indicarnos que el tipo de estimulación utilizado tiene diferente efectividad según actúe en células Th1 o Th2.

Por lo tanto, a la vista de esos resultados, podemos decir que las células con fenotipo de secreción Th2 se comportan de forma semejante en pacientes atópicos sin inmunoterapia y en individuos sanos, siempre que se mantienen libres de estímulos en su microambiente, independientemente de que los individuos, en el momento de extracción de las muestras, estuvieran o no sometidos a una estimulación alérgica ambiental.

De acuerdo con esto, no podemos decir que exista un nivel basal de secreción de citoquinas con fenotipo Th2 en las PBMC de los pacientes atópicos, *in vitro*.

Ese comportamiento cambia en el momento en que sometemos a las PBMC a algún estímulo, como la adición de PHA a su medio de cultivo. Así, las células del grupo de pacientes atópicos muestran en sus sobrenadantes

concentraciones superiores tanto de IL-4 como de IL-5, que las células procedentes de los individuos sanos.

Además, esa particularidad se pone de manifiesto tanto en la época en la que los pacientes están sometidos a una estimulación ambiental, como fuera de ella.

Por lo tanto, esa sería una condición que no dependería, al menos exclusivamente, del grado de exposición alérgica ambiental de los individuos.

La respuesta a la estimulación con PMA más ionomicina es menos concluyente a la hora de establecer un patrón de comportamiento de las células Th2, pero nos sugiere que la respuesta de esta subpoblación de células a dicha estimulación tiende a ser mayor en los individuos atópicos que en los que no lo son, únicamente cuando existe una estimulación alérgica ambiental (T1).

No obstante, los resultados de los estudios realizados en este campo muestran resultados no del todo concordantes. En un reciente trabajo, Mori *et al* ⁽¹⁵⁹⁾, estudiando el estímulo producido por la combinación de un éster de phorbol y un ionóforo de calcio en cultivos de PMBC de sujetos atópicos, observan que no existen diferencias entre estos e individuos sanos, en su

capacidad para producir IL-4 e IFN- γ , pero sí en lo referente a la IL-5. Sin embargo no sabemos las condiciones ambientales a las que estaban sometidos los individuos objeto del estudio.

En este punto, a la hora de encontrar alguna razón que justifique el comportamiento heterogéneo de la estimulación con PMA más ionomycinina, sin ser concluyentes, los resultados nos sugieren que en T1 habría un efecto facilitador de la exposición alérgica ambiental en los pacientes, mientras que en T2 ese efecto favorecedor no existiría.

Otros autores ⁽⁵⁴⁾ ya han sugerido con anterioridad la existencia de ese efecto *priming* para explicar la distinta respuesta que se observa en los sujetos monosensibles frente a los polisensibilizados.

Por otra parte, vemos que en los niveles de IL-4 la significación estadística se pierde después de las primeras 24 h. lo que nos hace pensar que ese efecto facilitador es máximo en esas primeras 24 h. para luego ir decreciendo a lo largo del tiempo, al menos si no se repite la estimulación.

De todas formas para poder establecer resultados más concluyentes en este aspecto, seguramente haría falta un estudio más amplio de las curvas concentración/tiempo, para cada citoquina.

A su vez, el comportamiento que se observa en las células con fenotipo de secreción Th1, pone de manifiesto que no haría falta ningún tipo de estimulación para que haya diferencias en la secreción de IFN- γ entre atópicos e individuos sanos, tanto en presencia como en ausencia de estimulación alérgica ambiental de los individuos.

Esto nos conduce a pensar que, en nuestro caso, las células con fenotipo Th1 muestran un nivel basal de secreción de IFN- γ mayor en los individuos atópicos que en los individuos no atópicos. Aunque pueda parecer que esto entra en contradicción con la preferente diferenciación de las células T hacia un fenotipo de Th2 en los sujetos atópicos, no lo es tanto si pensamos que esa preferencia no sería otra cosa que un desbalance en la respuesta frente a determinados antígenos.

La respuesta de estas células Th1 a la estimulación con PHA, también se muestra diferente entre sujetos atópicos e individuos sanos, siendo mayor en los primeros, ya sea en época de estimulación alérgica del individuo o fuera de ella. Sin embargo, la estimulación mediante PMA más ionomicina no establece diferencias con significación estadística entre las concentraciones de IFN- γ detectadas en el grupo de pacientes y en el grupo de voluntarios sanos,

tanto durante la época en que existían niveles reactivos de alergenos en el ambiente como fuera de ella.

La respuesta diferente ante las dos vías de estimulación utilizadas nos induce a pensar que esta subpoblación Th1 inhibiría de alguna forma su respuesta en los individuos sanos, desapareciendo esta barrera cuando la estimulación incide en las rutas intracitoplasmáticas de activación, evitando la señal del receptor. Esto sería así, según los resultados obtenidos, sin perjuicio de que la respuesta en los individuos atópicos varíe según se encuentren o no, bajo una estimulación alérgica ambiental, como veremos más adelante.

En concordancia con lo publicado anteriormente por otros autores ⁽⁴⁶⁻⁵⁴⁾, los resultados de nuestro estudio también sugieren la condición heterogénea de la enfermedad atópica .

Dicha heterogeneidad se pone de manifiesto si observamos la dispersión de los datos referentes a las concentraciones de los diferentes factores solubles, lo cual nos viene a confirmar que no todos los individuos atópicos responden de la misma forma ni con la misma intensidad frente a un estímulo concreto.

No obstante, en nuestro caso, la dispersión es menos valorable al tratarse de muestras pequeñas en las que este tipo de medidas pierden fiabilidad.

Un aspecto que queremos destacar de nuestro estudio, es que los estímulos utilizados tienen mecanismos diferentes de actuación sobre los linfocitos, a la hora de poner en marcha la respuesta inmune. Así, mientras la PHA actúa a nivel de la superficie celular, poniendo en marcha el mecanismo de respuesta desde sus fases más iniciales, la combinación de PMA más ionomicina nos permite actuar sobre pasos más avanzados (activación de la PKC) dentro de las vías intracelulares que conducen a la misma respuesta.

Conociendo esas distintas formas de actuación, podemos evaluar mejor las posibles diferencias en la secreción de citoquinas cuya causa radique, presumiblemente, en el reconocimiento del antígeno a nivel de los receptores de la membrana celular, o bien en la transducción de la señal a través de la membrana.

En este sentido, en una primera observación de los resultados obtenidos en nuestro estudio, llama la atención el hecho de que, respecto a la acción de los mitógenos, la combinación de PMA más ionomicina, a las concentraciones

utilizadas por nosotros, se mostraba más eficaz que la PHA para estimular la secreción de citoquinas por las PBMC cultivadas; y esto ocurría así tanto en el grupo de pacientes atópicos como en el grupo de individuos sanos.

No obstante, dado que éste es un aspecto que, presumiblemente, pueda depender de la concentraciones de mitógenos utilizadas, escapando esta posibilidad a la intención de nuestro trabajo, no lo hemos considerado como un dato concluyente.

En este punto, lo que sí estimamos como un factor importante para evitar posibles sesgos en nuestro estudio, fue el mantenimiento de las mismas condiciones de cultivo para todos los individuos, y en esto se incluía la no variación de las concentraciones de los mitógenos, aunque aparentemente uno de los utilizados estuviera induciendo un mayor grado de estimulación sobre las células.

Tanto uno como otro tipo de estimulación, como era de esperar, establecieron diferencias en la secreción de citoquinas frente a las células no estimuladas con mitógenos, pertenecientes a los mismos individuos.

Como vimos anteriormente, a la hora de establecer diferencias entre las concentraciones detectadas en el grupo de pacientes atópicos y en el grupo

control, los distintos mitógenos actuaron de forma diferente según se tratara de la secreción de citoquinas con patrón Th1 o Th2.

No hemos encontrado muchos trabajos en la bibliografía que aporten datos comparativos entre ambos tipos de mitógenos en los sujetos atópicos, por lo que nos es difícil contrastar los datos obtenidos. Sí sabemos que la activación farmacológica de la PKC mediante los ésteres de phorbol, en combinación con ionóforos de calcio, constituye un estímulo suficiente para la producción de IL-2 ⁽¹³¹⁻¹³³⁾. De hecho, la activación de la PKC juega un importante papel en la vía de la IL-4 y del CD40, que conducen al cambio de isotipo en la células B ⁽¹⁶⁰⁾.

Si nos atenemos a los resultados del grupo de individuos sanos, los diferentes tipos de estimulación utilizados en nuestro estudio obtuvieron respuestas semejantes en el T1 y en el T2. Es decir, tanto en las células sin estimular como en aquellas que se cultivaron en presencia de PHA y en las que lo fueron con PMA más ionomicina, cada uno de esos niveles de estimulación se mantuvo sin variaciones significativas en el T1 y en el T2, en el grupo control, tanto para las citoquinas que sugieren un patrón de secreción Th1 como para las que corresponden al Th2.

Si nos fijamos en el grupo de pacientes atópicos, esos diferentes niveles de estimulación que considerábamos en el párrafo anterior, sí presentaron diferencias significativas, y a su vez, éstas fueron en distintas series según se tratara de citoquinas correspondientes al patrón Th1 o al Th2.

En ese sentido, podemos observar cómo la concentración de IFN- γ no presenta diferencias significativas entre T1 y T2 cuando utilizamos PMA más ionomicina en la estimulación de las PMBC. Sin embargo, la PHA sí establece diferencias en su estimulación entre T1 y T2, dado que las diferencias en las concentraciones detectadas a las 24 h. y al considerar los niveles máximos alcanzados presentan significación estadística, quedando al borde de esa significación los resultados obtenidos a las 48 h. de cultivo.

Como hemos comentado anteriormente, esa pérdida de significación a las 48 h. pudiera depender del efecto limitado en el tiempo de la estimulación ejercida por el mitógeno, o bien por la distinta cinética de esa estimulación en T1 y en T2.

Por su parte, las concentraciones de IL-4 y de IL-5 en el grupo de pacientes atópicos, que corresponderían fundamentalmente a las células que siguen el patrón de secreción Th2, manifiestan diferente grado de estimulación con PMA más ionomicina, según se trate del T1 o del T2. Esa diferencia en la

estimulación se manifiesta a las 24 h. de cultivo y se mantiene al menos a las 48 h. del mismo.

En cuanto a la acción de la PHA, ésta manifiesta diferente grado de estimulación entre T1 y T2 fundamentalmente a las 24 h. de cultivo, aunque en el caso de la IL-5 esa diferencia se mantiene a las 48 h. del mismo.

En cuanto a una posible variación de la secreción de citoquinas, según estuviéramos en la época de estimulación antigénica ambiental de los pacientes o fuera de ella, ambos mitógenos tuvieron comportamientos heterogéneos.

El efecto de la exposición natural al alérgeno en los linfocitos periféricos aún no ha sido bien determinada. En trabajos previos de nuestro grupo ⁽¹⁶¹⁾, se ha constatado que durante la época en que existen niveles reactivos de pólenes en la atmósfera, en los pacientes con asma polínica se encuentra un aumento de la proporción CD4/CD8^{bright} y un descenso en la cifra media de antígenos CD4 por célula, sugiriendo que los linfocitos CD4+ se pueden asociar al mecanismo patogénico causal del asma estacional.

Nosotros hemos querido, en nuestro trabajo, llevar a cabo un mayor acercamiento a dicha influencia de la exposición alérgica ambiental sobre la respuesta del individuo alérgico.

En este sentido, por un lado, en los cultivos correspondientes a los pacientes atópicos, tanto la estimulación con PHA como la ejercida mediante PMA e ionomicina, lograron concentraciones más altas de IL-4 y de IL-5 durante el T1 que durante el T2; sin embargo, la concentración de IFN- γ era más elevada en T2 que en T1.

Esto pondría de manifiesto el fenotipo de secreción de tipo Th2 predominante en los pacientes atópicos. No obstante, no siempre estas diferencias tuvieron significación estadística.

A la hora de considerar las diferencias estadísticamente significativas, pudimos observar que la PHA establecía ese tipo de diferencias entre T1 y T2, sólo en las determinaciones de IL-4 y de IFN- γ a las 24 h. de cultivo y en las de IL-5 a las 48 h. de cultivo, o al considerar los valores máximos alcanzados de IFN- γ .

Lo más llamativo, a nuestro juicio, son los resultados de la combinación de PMA más ionomicina sobre la secreción de factores solubles en los cultivos

de PBMC en el grupo de pacientes atópicos. La actuación de este mitógeno, como dijimos anteriormente, consigue concentraciones de citoquinas más altas que la PHA, y esto ocurre así tanto en los cultivos del grupo de pacientes atópicos como en los realizados con el grupo control. Sin embargo, sólo consigue establecer diferencias significativas, desde el punto de vista estadístico, en los casos de la IL-4 y de la IL-5. Esto es, no observamos que el efecto del PMA junto con la ionomicina establezca diferencias en la concentración de IFN- γ en los sobrenadantes de los cultivos celulares, ni en el grupo de pacientes atópicos ni en el grupo control de individuos sanos, al comparar las determinaciones de los cultivos realizados en T1 con los llevados a cabo en el T2.

Esto nos sugiere que, del mismo modo que distintos Ag (bacterianos, helmínticos, alérgenos) pueden inducir respuestas Th1 ó Th2 de forma preferente, quizá los mitógenos tengan también algún tipo de selectividad, que se ponga de manifiesto en determinadas circunstancias.

De esta forma, a la vista de los resultados obtenidos para la secreción IFN- γ en cultivos de PBMC procedentes de pacientes atópicos, podríamos decir que las células con fenotipo de secreción Th1, no varían en su capacidad para segregar IFN- γ cuando se someten a una estimulación inespecífica con PMA más ionomicina, ya sea durante la época de estimulación antigénica del

individuo o fuera de ella. Por el contrario, esa secreción si manifiesta diferencias entre una y otra época, cuando se estimula de forma inespecífica con un mitógeno que actúa de forma selectiva a nivel de la membrana celular como es la PHA.

Al hilo de este razonamiento, se podría establecer la hipótesis de que el efecto facilitador (*priming*) que ejerce la estimulación alérgica ambiental sobre el sistema inmune del individuo atópico, se reflejaría en las células con fenotipo Th1, sólomente si éstas se someten a un estímulo que incida a nivel de los receptores de membrana (v.g.: PHA), y no si lo hacemos en pasos posteriores de las vías de transducción de la señal del receptor (v.g.: PMA).

Por el contrario, las células con fenotipo Th2 (secretoras de IL-4 e IL-5) manifiestan ese efecto facilitador de la exposición alérgica ambiental, tanto en su estimulación a nivel del receptor de membrana con PHA, como en la realizada en pasos porteriores mediante PMA más ionomicina. Por lo tanto, a la vista de estos resultados, parece que existirían diferencias en cuanto a la sensibilidad frente a los mitógenos de las células con fenotipo de secreción Th1 y las Th2.

De todo esto, podemos concluir la importancia que tiene el estudio del comportamiento de los clones Th1 y Th2 en los sujetos atópicos bajo

diferentes condiciones y estímulos, para llegar a comprender cada vez de forma más completa sus funciones y en qué circunstancias éstas se pueden ver alteradas.

Recientemente, Caspi *et al* ⁽¹⁶²⁾, han estudiado la interacción entre diferentes clones de células Th *in vivo*, así como los parámetros que pueden afectarla, demostrando que dicha interacción se caracteriza tanto por efectos agonistas como antagonistas, y que la mayoría de los efectos ejercidos por un tipo sobre el otro son mediados por la IL-4 y el IFN- γ .

Por tanto, el estudio del comportamiento de estas citoquinas frente a diferentes estímulos es un índice de la actividad de los clones de células Th de los que provienen.

Incluso, hay autores ⁽¹⁶³⁾ que sugieren que la producción relativa de IL-4 e IFN- γ de los clones de células T específicas para alérgenos, podría ser útil para valorar si la respuesta de anticuerpos IgE está relacionada con un potencial para desarrollar reacciones anafilácticas.

En lo que respecta a la influencia de la inmunoterapia específica en los perfiles de secreción de citoquinas de los pacientes atópicos, aunque nuestro trabajo ni ha ido dirigido a estudiar ese efecto concreto, sí nos ha permitido apuntar algún aspecto digno de mención. Algunos autores han podido

establecer que la cantidad de IL-4 producida por las células T CD4+ alergenoespecíficas puede verse reducida de forma considerable al recibir inmunoterapia específica ⁽⁵⁰⁾, corroborándose ese efecto, en cierta forma, por la variación en las manifestaciones clínicas de la enfermedad atópica con ese tipo de tratamiento ^(51, 164).

Hemos de recordar que una ventaja fundamental de la inmunoterapia en el tratamiento de la alergia, puede ser su interferencia en los mecanismos fisiopatológicos responsables de la liberación de mediadores ^(165, 166). Al bloquearse la liberación de mediadores, se puede reducir la acumulación de células efectoras con perfil Th2, que se observa durante la fase tardía de la reacción alérgica, lo que impediría la activación de las células B y la síntesis de IgE mediada por la IL-4 ⁽¹⁶⁷⁾.

De hecho, Durham *et al* ⁽¹⁶⁸⁾ sostienen que la inmunoterapia induce un cambio en el perfil de secreción de citoquinas de Th2 a Th1. Dicho cambio provocaría una inhibición de la síntesis de IgE inducida por la IL-4, y, secundariamente, también reduciría la activación de los mastocitos ^(169, 170). Por otra parte, la reducción de la liberación de la IL-5 disminuiría la actividad de los eosinófilos, produciendo una menor inflamación y destrucción celular ⁽¹⁷¹⁾.

Así pues, los resultados de nuestra serie de pacientes con inmunoterapia específica apuntan en la misma dirección que la de otros autores reseñados; es

decir, que la inmunoterapia específica como tratamiento que incide en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad, puede corregir, al menos en cierta medida, aquellos cambios en la secreción de ciertas citoquinas (IL-4 e IL-5) que en los pacientes atópicos dan lugar a la aparición de los síntomas clínicos.

De hecho, aunque la serie de pacientes sea relativamente corta, ya nos muestra de una forma estadísticamente significativa, que la diferencia existente en la secreción de IL-4 e IL-5 en los pacientes atópicos sin inmunoterapia, cuando estaban sometidos a la exposición ambiental del alérgeno sensibilizante, no aparece en los pacientes con inmunoterapia específica.

Finalmente, como último aspecto valorado en nuestro estudio, hemos de decir que la correlación entre IL-4 e IL-5 se pone de manifiesto, fundamentalmente en los cultivos realizados durante la época en que había niveles reactivos de pólenes en la atmósfera, y dentro de éstos en los casos en que las PBMC eran estimuladas con PHA. En este punto hemos de recordar que no se debe confundir una correlación significativa con causalidad, sino

más bien con la posible existencia de un factor común que incide sobre las variables en cuestión.

Esto concuerda con el hecho de que ambas citoquinas sean segregadas por células con el mismo fenotipo secretor Th2, aunque no podamos asegurar que la cinética de secreción de las dos siga el mismo patrón en el tiempo. No obstante, sí nos sirve para resaltar la importancia de la IL-5 en la respuesta alérgica. No en vano, recientes estudios de Schulze *et al* ⁽¹⁷²⁾, han aportado más pruebas de que la eosinofilia que aparece en sangre y tejidos durante la respuesta alérgica está mediada por células T secretoras de IL-5, alergenoespecíficas.

6. CONCLUSIONES

Primera. Las células mononucleares de sangre periférica de pacientes polínicos, *in vitro*, presentan niveles basales de secreción de IL-4 e IL-5 (citoquinas correspondientes a un patrón de secreción Th2) semejantes a las de los individuos sanos, tanto en la época de exposición alérgica como fuera de ella.

Segunda. La estimulación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica, procedentes de individuos con hipersensibilidad a pólenes, con phorbol-miristato-acetato en presencia de ionomicina, da lugar a un aumento en la secreción de IL-4 e IL-5.

Tercera. El incremento en la secreción de IL-4 e IL-5 por células mononucleares de sangre periférica de individuos polínicos, estimuladas por PMA más ionomicina, es mayor si los pacientes están sometidos en su ambiente a niveles reactivos de los polenes frente a los cuales están sensibilizados.

Cuarta. La concentración de IFN- γ en el sobrenadante de cultivos de células mononucleares de sangre periférica, procedentes de individuos

alérgicos a pólenes, se incrementa tras la estimulación *in vitro* con fitohemaglutinina.

Quinta. El aumento de la secreción *in vitro* de IFN- γ , procedente de células mononucleares de sangre periférica de pacientes polínicos, tras su estimulación con PHA, se hace más significativo en la época en la que los individuos no están expuestos a niveles reactivos de pólenes en su ambiente.

Sexta. Las concentraciones de IFN- γ , IL-4 e IL-5 en el sobrenadante de los cultivos de células mononucleares de sangre periférica, procedentes de individuos sanos, *in vitro*, no manifiestan diferencias según estén los sujetos sometidos o no a niveles reactivos de pólenes en la atmósfera.

Séptima. La presencia de niveles reactivos de pólenes en la atmósfera, puede favorecer una respuesta basada en la secreción de citoquinas con fenotipo Th2 frente a mitógenos inespecíficos, al menos *in vitro*, en los individuos atópicos sensibilizados frente a dichos pólenes.

Octava. La presencia en la atmósfera de niveles reactivos de pólenes, favorece, *in vitro*, la disminución de la respuesta de tipo Th1 en los pacientes sensibilizados frente a dichos pólenes.

Novena. Las variaciones en la concentración de IL-5 en el sobrenadante de los cultivos de células mononucleares de sangre periférica, procedentes de individuos polínicos, en respuesta a fitohemaglutinina, presentan *in vitro* una correlación positiva con las variaciones que experimentan las concentraciones de IL-4 en dichos cultivos, si éstos se llevan a cabo cuando los sujetos están sometidos a niveles reactivos de pólenes en la atmósfera.

Décima. Los pacientes polínicos, habiendo recibido inmunoterapia específica durante al menos dos años, no presentan *in vitro* diferencias en cuanto a la secreción de citoquinas del perfil Th2, ya estén sometidos o no a la presencia de niveles reactivos de pólenes en su ambiente.

Undécima. El phorbol-miristato-acetato en presencia de ionomicina, a las concentraciones utilizadas en nuestro estudio, se ha mostrado *in vitro* como un mitógeno eficaz a la hora de mostrar que el fenotipo de secreción

Th2 se hace más evidente, en cultivos de células mononucleares de sangre periférica procedentes de individuos polínicos, durante la época en que los sujetos se encuentran expuestos a concentraciones reactivas de pólenes en la atmósfera.

Duodécima. La fitohemaglutinina, a las concentraciones utilizadas en nuestro trabajo, se ha mostrado eficaz para la demostración *in vitro* de las diferencias existentes entre pacientes polínicos e individuos sanos, en la secreción de IL-4, IL-5 e IFN- γ .



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Maggi E, Romagnani S, Ricci M. Regulatory mechanisms of IgE synthesis and their deregulation in atopy. *Allergol Immunopathol (Madrid)* 1992; 20: 165-9.
2. Coffman RL, Carty J. A T-cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon- γ . *J Immunol* 1986; 136: 949-54.
3. Romagnani S. Regulation and deregulation of human IgE synthesis. *Immunol Today* 1990; 1: 316-21.
4. Geha RS. Regulation of IgE synthesis in humans. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 143-50.
5. Dávila González I. Regulación de la síntesis de IgE. *Rev Esp Alergol Immunol Clín* 1995; 10: 235-49.
6. Vercelli D, Geha RS. Regulation of IgE synthesis in humans: a tale of two signals. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 285-95.
7. Coffman RL, O'Hara J, Bond MW, Carty J, Zlotnik E, Paul WE. B cell stimulatory factor-I enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cell. *J immunol* 1986; 136: 4538-41.
8. Del Prete GF, Maggi E, Parronchi P, Chrétien I, Tiri A, Macchia D, Ricci M, Banchereau J, de Vries JE, Romagnani S. IL-4 is an essential factor

for the IgE synthesis induced *in vitro* by human T cells clones and their supernatants. *J Immunol* 1988; 140: 4193-8.

9. Maggi E, del Prete GF, Macchia D, Parronchi P, Tiri A, Chrétien I, Ricci M, Romagnani S. Profiles of lymphokine activities and helper function for IgE in human T-cell clones. *Eur J Immunol* 1988; 18: 1045-50.

10. Chrétien I, Pène J, Brière F, et al. Regulation of human IgE synthesis. I. Human IgE synthesis is determined by the reciprocal antagonistic effects of interleukin-4 and interferon- γ . *Eur J Immunol* 1990; 20: 243-9.

11. Rousset F, Robert J, Andary M, et al. Shifts in interleukin-4 and interferon-gamma production by T cells of patients with elevated serum IgE levels and the modulatory effects of these lymphokines on spontaneous IgE synthesis. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 58-69.

12. Pène J, Rousset F, Brière F, Chrétien I, Bonnefoy JY, Spits H, Yokota T, Arai N, Arai KI, Banchereau J, de Vries JE. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons γ and α and prostaglandin E_2 . *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6880-4.

13. Renz H, Or R, Domenico J, Leung DY, Gelfand EW. Reciprocal regulatory effects of IL-4 on cell growth and immunoglobulin production in Ig-secreting human B cell lines. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 6: 233-41.

14. Claassen JL, Levine AD, Buckley R. Recombinant human IL-4 induces IgE and IgG synthesis by normal and atopic donor mononuclear cells. *J Immunol* 1990; 144: 2123-30.
15. Gauchat JF, Lebman DA, Coffman RL, Gascan H, De Vries JE. Structure and expression of germline ϵ transcrip in human B cells induced by interleukin-4 to switch to IgE production. *J Exp Med* 1990; 172: 463-73.
16. Vercelli D, Jabara HH, Aräi KI, Geha RS. Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC class II antigens. *J Exp Med* 1989; 169: 1295-307.
17. Purkerson J, Isakson P. A two-signal model for regulation of immunoglobulin isotype switching. *FASEB J* 1992; 6: 3245-52.
18. Maggi E, del Prete GF, Parronchi P, Tiri A, Macchia D, Biswas P, Simonelli C, Ricci M, Romagnani S. Role of T cells, IL-2 and IL-6 in the IL-4-dependent *in vitro* human IgE synthesis. *Immunology* 1989; 68: 300-6.
19. Gascan H, Gauchat JF, Roncarolo MG, Yssel H, Spits H, De Vries JE. Human B cells clones can be induced to proliferative and to switch to IgE and IgG₄ synthesis by interleukin-4 and a signal provided by activated CD4⁺ T cell clones. *J Exp Med* 1991; 173: 747-50.
20. Parronchi P, Tiri A, Macchia D, Biswas P, Simonelli C, Maggi E, del Prete GF, Ricci M, Romagnani S. Noncognate contact-dependent B cell

activation can promote IL-4-dependent *in vitro* human IgE synthesis. *J Immunol* 1990; 144: 2102-8.

21. Gascan H, Aversa G, Gauchat JF, Roncarolo MG, Yssel H, Van Vlasselaer P, Kehry M, Spits H, De Vries JE. Membranes of activated CD4+ T cells expressing T-cell receptors (TcR) $\alpha\beta$ or TcR $\gamma\delta$ induce IgE synthesis by human B cells in the presence of interleukin-4. *Eur J Immunol* 1992; 22: 1133-41.

22. Matshushita S, Katz DH. Identification of a T cell membrane protein possibly involved in IL-4-induced B cell immunoglobulin class switching to IgE. *Cell Immunol* 1994; 153: 378-91.

23. Van der Pouw-Kaan CT, Aalberse RC, Aarden LA. IgE production in atopic patients is not related to IL-4 production. *Clin Exp Immunol* 1994; 97: 254-9.

24. Defrance T, Carayon P, Billian G, et al. Interleukin-13 is a B cell stimulating factor. *J Exp Med* 1994; 179: 135-43.

25. Zurawski SM, Vega J Jr., Huyghe B, Zurawski G. Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. *EMBO J* 1993; 12: 2663-70.

26. Zurawski G, De Vries JE. Interleukin-13, an interleukin-4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today* 1994; 15: 19-26.

27. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, De Vries JE. Role of interleukin-4 and interleukin-13 in synthesis of IgE and expression of CD23 by human B cells. *Allergy* 1994; 49: 576.
28. Jabara HH, Fu SM, Geha RS, Vercelli D. CD40 and IgE: Synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin-4 in the induction of IgE synthesis by highly purified B cells. *J Exp Med* 1990; 172: 1861-4.
29. Cocks BG, De Waal-Malefyt R, Galizzi JP, De Vries JE, Aversa G. IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. *Int Immunol* 1993; 5: 657-63.
30. Zhang K, Clark EA, Saxon A. CD40 stimulation provides an IFN- γ -independent and IL-4-dependent differentiation signal directly to human B cells for IgE production. *J Immunol* 1991; 146: 1836-42.
31. Díaz Sánchez D, Chegini S, Zhang K, Saxon A. CD58 (LFA-3) stimulation provides a signal for human isotype switching and IgE production distinct from CD40. *J Immunol* 1994; 94: 222-30.
32. Shapira SK, Vercelli D, Jabara HH, Geha RS. Molecular analysis of the induction of IgE synthesis in human B cells induced by interleukin-4 and engagement of CD-40 antigen. *J Exp Med* 1992; 175: 289-92.
33. Gordon J. CD23 and B cell activation. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 199-204.

34. Sutton BJ, Gould HJ. The human IgE network. *Nature* 1993; 366: 421-8.
35. Walter H, Schepens S, Van Wauwe J, et al. Ligation of CD28 on resting B cells by its ligand B7 results in the induction of both Th1- and Th2-type cytokines. *Eur Cytokine Netw* 1994; 5: 13-21.
36. Seder RA, Germain RN, Linsley PS, et al. CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon gamma production. *J Exp Med* 1994; 179: 299-304.
37. Pène J, Rousset F, Brière F, Chrétien I, Wideman J, Bonnefoy JY, de Vries JE. Interleukin-5 enhances interleukin-4-induced human IgE production by normal T cells. The role of soluble CD23 antigen. *Eur J Immunol* 1988; 18: 929-35.
38. Vercelli D, Jabara HH, Araï K, et al. Endogenous interleukin-6 plays an obligatory role in interleukin-4-dependent human IgE synthesis. *Eur J Immunol* 1989; 19: 1419-24.
39. Punnonen J, De Waal-Malefyt R, Van Vlasselaer P, Gauchat JF, De Vries JE. IL-10 and viral IL-10 prevent IL-4-induced IgE synthesis by inhibiting the accessory cell function of monocytes. *J Immunol* 1993; 151: 1280-9.

40. Mc Glashan DW, Jr., White JM, Huang SK, Ono SN, Schroeder JT, Lichtenstein LM. Secretion of IL-4 from human basophils. The relationship between IL-4 mRNA and protein in resting and stimulated basophils. *J Immunol* 1994; 152: 3006-16.
41. Gordon JR, Burd RP, Galli SJ. Mast cell as a source of multifunctional cytokines. *Immunol Today* 1990; 11: 458-64.
42. Holgate ST, Howarth PH, Church MK, Okayama Y, Bradding P. Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J Immunol* 1995; 155: 297-307.
43. Luger TA, Schwarz T. The role of cytokines and neuroendocrine hormones in cutaneous immunity and inflammation. *Allergy* 1995; 50: 292-302.
44. Stadler BM. A new concept for human IgE regulation. *ACI News* 1991; 2: 53-7.
45. Stadler BM. Autoimmune and neuroendocrine regulation of the allergic response. *Allerg Immunol (Paris)* 1994; 26: 122-4.
46. Coca AF, Cooke RA. On the classification of the phenomena of hypersensitiveness. *J Immunol* 1922; 8: 163-70.
47. Pène J. Heterogeneity of atopy demonstrated by differences in cytokine release by peripheral blood T cells. *Ann Allergy* 1993; 71: 322-6.

48. Bousquet J, Hejjaoui A, Becker WM, et al. Clinical and immunologic reactivity of patients allergic to grass pollens and to multiple pollen species. I. Clinical and immunologic characteristics. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 737-46.
49. Pène J, Rivier A, Michel FB, et al. Heterogeneity of atopy demonstrated by differences in cytokine release by peripheral blood T cells. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 174-9.
50. Secrist H, Chelen CJ, Wen Y, et al. Allergen immunotherapy decreases interleukin-4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 1993; 178: 2123-30.
51. Bousquet J, Becker WM, Hejjaoui A, et al. Differences in clinical and immunologic reactivity of patients allergic to grass pollens and to multiple-pollen species. II. Efficacy of a double blind, placebo-controlled, specific immunotherapy with standardized extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 43-53.
52. Pène J, Rivier A, Lagier B, et al. Differences in IL-4 release by PBMC are related with heterogeneity of atopy. *Immunology* 1994; 81: 58-64.
53. Bousquet J, Pène J, Michel FB. Heterogeneity of atopy. *ACI News* 1992; 4: 49-53.

54. Bousquet J, Knani J, Hejjaoui A, et al. Heterogeneity of atopy. I. Clinical and immunological characteristics of patients allergic to cypress pollen. *Allergy* 1993; 48: 183-8.
55. Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, Ricci M, Romagnani S. Purified protein derivate (PPD) of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) (TES) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest* 1991; 88: 346-50.
56. Romagnani S. Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. *Immunol Today* 1991; 12: 256-7.
57. Del Prete GF, Tiri A, Maggi E, de Carli M, Macchia D, Parronchi P, Rossi ME, Pietrogrande MC, Ricci M, Romagnani S. Defective in vitro production of γ -interferon and tumor necrosis factor- α circulating T cells from patients with the hyperimmunoglobulin E syndrome. *J Clin Invest* 1989; 84: 1830-5.
58. Sanderson CJ, Warren DJ, Strath M. Identification of a lymphokine that stimulates eosinophil differentiation in vitro. Its relationship to IL-3, and functional properties of eosinophils produced in culture. *J Exp Med* 1985; 162: 60-74.
59. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles

of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-57.

60. Romagnani S, del Prete GF, Maggi E, Parronchi P, Tiri A, Macchia D, Giudizi MG, Almerigogna F, Ricci M. Role of interleukines in induction and regulation of human IgE synthesis. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 50: S13-23.

61. Maggi E, Biswas P, del Prete GF, Parronchi P, Macchia D, Simonelli C, Emmi L, de Carli M, Tiri A, Ricci M, Ramagnani S. Accumulation of Th2-like helper T cells in the conjunctiva of patients with vernal conjunctivitis. *J Immunol* 1991; 146: 1169-74.

62. Hamid Q, Azzawi M, Ying S, Moqbel R, Wardlaw AJ, Corrigan CJ, Bradley B, Durham SR, Collins JV, Jeffery PK, Quint DJ, Kay AB. Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. *J Clin Invest* 1991; 87: 1541-84.

63. Looney RJ, Pudiak D, Rosenfeld SI. Cytokine production by mite-specific T cells from donors with mild atopic disease. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 476-83.

64. Parronchi P, de Carli M, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Macchia D, Maggi E, del Prete GF, Ricci M, Romagnani S. Aberrant interleukin (IL)-4 and IL-5 production *in vitro* by CD4+ helper T cells from atopic subjects. *Eur J Immunol* 1992; 22: 1615-20.

65. Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP, Biswas P, Simonelli C, Maggi E, Ricci M, Ansari AA, Romagnani S. Allergen and bacterial antigen-specific T cells clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4538-42.
66. Surcel HM, Troye-Blomberg M, Paulie S, et al. Th1/Th2 profiles in tuberculosis based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. *Immunology* 1994; 89: 171-6.
67. Wierenga EA, Snoek M, De Groot C, Chrétien I, Bos JD, Jansen HM, Kapsenberg M. Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD4+ T lymphocytes in atopic patients. *J Immunol* 1990; 144: 4651-6.
68. Maggi E, Romagnani S, Ricci M. Regulatory mechanisms of IgE synthesis and their deregulation in atopy. *Allergol Immunopathol (Madrid)* 1992; 20: 165-9.
69. Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Santoni-Rugiu F, de Carli M, Ricci M, Romagnani S. Reciprocal regulatory effects of IFN- γ and IL-4 on the *in vitro* development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* 1992; 148: 2142-7.
70. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 635-73.
71. Manetti R, Gerosa F, Giudizi MG, et al. Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN- γ) production during differentiation of

human T helper (Th) cells and transient IFN- γ production in established Th2 cell clones. *J Exp Med* 1994; 179: 1273-83.

72. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; 61: 203-12.

73. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 1989; 58: 573-81.

74. Finkel TH, Marrack P, Kappler JW, Kubo RT, Cambier JC. $\alpha\beta$ T cell receptor and CD3 transduce different signals in immature T cells: Implications for selection and tolerance. *J Immunol* 1989; 142: 3006-12.

75. Gajewski TF, Schell SR, Fitch FW. Evidence implicating utilization of different T cell receptor-associated signaling pathways by TH1 and TH2 clones. *J Immunol* 1990; 144: 4110-20.

76. Betz M, Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol* 1991; 146: 108-13.

77. Horgan KJ, Van Severter GA, Shimizu Y, Shaw S. Hyporesponsiveness of "naive" (CD45RA+) human T cells to multiple receptor-mediated stimuli but augmentation of responses by co-stimuli. *Eur J Immunol* 1990; 20: 1111-8.

78. Sanders ME, Makgoba MW, June CH, Young HA, Shaw S. Enhanced responsiveness of human memory T cells to CD2 and CD3 receptor-mediated activation. *Eur J Immunol* 1989; 19: 803-8.
79. Siegel JN, June CH. Signal transduction in T cell activation and tolerance. En: *New concepts in immunodeficiency diseases*. Gupta S, Griscelli C, eds. John Wiley & Sons, Ltd. Boston, 1993; 85-129.
80. Ashwell JD, Klausner RD. Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 139-67.
81. Klausner RD, Lippincott-Schwartz J, Bonifacino JS. The T cell antigen receptor: Insights into organelle biology. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 403-31.
82. Samelson LE, Patel MD, Weissman AM, Hardford JB, Klausner RD. Antigen activation of murine T cells induce tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell* 1986; 46: 1083-90.
83. Baniyash M, García-Morales P, Bonifacino JS, Samelson LE, Klausner RD. Disulfide linkage of the ζ and η chains of the T-cell receptor: Possible identification of two structural classes of receptors. *J Biol Chem* 1988; 263: 9874-8.
84. Orloff DG, Ra CS, Frank SJ, Klausner RD, Kinet JP. Family of disulphide-linked dimers containing the ζ and η chains of the T-cell receptor and the γ chain of Fc receptors. *Nature* 1990; 347: 189-91.

85. Raulet DH. The structure, function, and molecular genetics of the gamma/delta T cell receptor. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 175-207.
86. Allison JP, Raulet DH. The immunobiology of gamma delta+ T cells. *Semin Immunol* 1990; 2: 59-65.
87. Blumberg RS, Ley S, Sancho J, Lonberg N, Lacy E, McDermott F, Schad V, Greenstein JL, Terhorst C. Structure of the T-cell antigen receptor: Evidence for two CD3 ϵ subunits in the T-cell receptor-CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7220-4.
88. Coulie PG, Uyttenhove C, Wauters P, Manolios N, Klausner RD, Samelson LE, van Snick J. Identification of a murine monoclonal antibody specific for an allotypic determinant on mouse CD3. *Eur J Immunol* 1991; 21: 1703-9.
89. Irving BA, Weiss A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor ζ chain is sufficient to couple receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* 1991; 64: 891-901.
90. Romeo C, Seed B. Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides. *Cell* 1991; 64: 1037-46.
91. Letourneur F, Klausner RD. Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 ϵ . *Science* 1992; 255: 79-82.

92. Patel MD, Samelson LE, Klausner RD. Multiple kinases and signal transduction: Phosphorylation of the T cell antigen receptor complex. *J Biol Chem* 1987; 262: 5831-8.
93. Klausner RD, Samelson LE. T cell antigen receptor activation pathways: The tyrosine kinase connection. *Cell* 1991; 64: 875-8.
94. Siegel JN, Egerton M, Phillips AF, Samelson LE. Multiple signal transduction pathways activated through the T cell receptor for antigen. *Semin Immunol* 1991; 3: 325-34.
95. Weiss A, Irving BA, Tan LK, Koretzky GA. Signal transduction by the T cell antigen receptor. *Semin Immunol* 1991; 3: 313-24.
96. Weiss A, Imboden J, Hardy K, Manger B, Terhorst C, Stobo J. The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation. *Annu Rev Immunol* 1986; 4: 593-619.
97. June CH, Fletcher MC, Ledbetter JA, Samelson LE. Increases in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation. *J Immunol* 1990; 144: 1591-9.
98. June CH, Fletcher MC, Ledbetter JA, Schieven GL, Siegel JN, Phillips AF, Samelson LE. Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents T-cell receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7722-6.

99. Hunter T. Protein-tyrosine phosphatases: The other side of the coin. *Cell* 1990; 58: 1013-6.

100. Rudd CE, Trevillyan JM, Dasgupta JD, Wong LL, Schlossman SF. The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 5190-4.

101. Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Bolen JB. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase *p56^{lck}*. *Cell* 1988; 55: 301-8.

102. Turner JM, Brodsky MH, Irving BA, Levin SD, Perlmutter RM, Littman RD. Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase *p56^{lck}* with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* 1990; 60: 755-65.

103. Shaw AS, Chalupny J, Whitney JA, Hammond C, Amrein KE, Kavathas P, Sefton BM, Rose JK. Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the amino-terminal domain of the *p56^{lck}* protein tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 1853-62.

104. Abraham N, Miceli MC, Parnes JR, Veillette A. Enhancement of T-cell responsiveness by the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase *p56^{lck}*. *Nature* 1991; 350: 62-6.

105. Samelson LE, Phillips AF, Luong ET, Klausner RD. Association of the *fyn* protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 4358-62.
106. Cooke MP, Abraham KM, Forbush KA, Perlmutter RM. Regulation of the Tcell receptor signaling by a *src* family protein-tyrosine kinase (*p59^{lck}*). Cell 1991; 65: 281-91.
107. Chan AC, Irving BA, Fraser JD, Weiss A. The ζ chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 9166-70.
108. Trowbridge IS. CD45: A prototype for transmembrane protein tyrosine phosphatases. J Biol Chem 1991; 266: 23517-20.
109. Weiss A, Koretzky G, Schatzman RC, Kadlecsek T. Functional activation of the T-cell antigen receptor induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 5484-8.
110. Park DJ, Min HK, Rhee SG. Inhibition of CD3-linked phospholipase C by phorbol ester and by cAMP is associated with decreased phosphotyrosine and increased phosphoserine contents of PLC γ 1. J Biol Chem 1992; 267: 1496-501.

111. Secrist JP, Karnitz L, Abraham RT. T-cell antigen receptor ligation induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1. *J Biol Chem* 1991; 266: 12135-9.

112. Nishibe S, Wahl MI, Hernández-Sotomayor SM, Tonks NK, Rhee SG, Carpenter G. Increase of the catalytic activity of phospholipase C- γ 1 by tyrosine phosphorylation. *Science* 1990; 250: 1253-6.

113. Goldschmidt-Clermont PJ, Kim JW, Machesky LM, Rhee SG, Pollard TD. Regulation of phospholipase C- γ 1 by profilin and tyrosine phosphorylation. *Science* 1991; 251: 1231-3.

114. Kim HK, Kim JW, Zilberstein A, Margolis B, Kim JG, Schlessinger J, Rhee SG. PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC- γ 1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254. *Cell* 1991; 65: 435-41.

115. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988; 334: 661-5.

116. Masmoudi A, Labourdette G, Mersel M, Huang FL, Huang KP, Vincendon G, Malviya AN. Protein kinase C located in rat liver nuclei: Partial purification and biochemical and immunochemical characterization. *J Biol Chem* 1989; 264: 1172-9.

117. Davies AA, Cantrell DA, Hexham JM, Parker PJ, Rothbard J, Crumpton MJ. The human T3- γ chain is phosphorylated at serine 126 in response to T lymphocyte activation. *J Biol Chem* 1987; 262: 10918-21.
118. Jain J, McCaffrey PG, Valge-Archer VE, Rao A. Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature* 1992; 356: 801-4.
119. Desai DM, Newton ME, Kadlecsek T, Weiss A. Stimulation of the phosphatidylinositol pathway can induce T-cell activation. *Nature* 1990; 348: 66-9.
120. Sussman JJ, Mercep M, Saito T, Germain RN, Bonvini E, Ashwell JD. Dissociation of phosphoinositide hydrolysis and Ca^{2+} fluxes from the biological responses of a T-cell hybridoma. *Nature* 1988; 334: 625-8.
121. O'Shea JJ, Ashwell JD, Bailey TL, Cross SL, Samelson LE, Klausner RD. Expression of *v-src* in a murine T-cell hybridoma results in constitutive T-cell receptor phosphorylation and IL-2 production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1741-5.
122. Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990; 248: 1349-56.
123. Linsley PS, Clark EA, Ledbetter JA. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5031-5.

124. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmarie LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 1991; 174: 561-9.

125. Lindsten T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 1989; 244: 339-43.

126. Fraser JD, Irving BA, Crabtree GR, Weiss A. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 1991; 251: 313-6.

127. June CH, Ledbetter JA, Lindsten T, Thompson CB. Evidence for the involvement of three distinct signals in the induction of IL-2 gene expression in human T lymphocytes. *J Immunol* 1989; 143: 153-61.

128. Saltzman EM, Thom RR, Casnellie JE. Activation of a tyrosine protein kinase is an early event in the stimulation of T lymphocytes by IL-2. *J Biol Chem* 1988; 263: 6956-9.

129. Mills GB, May C, McGill M, Fung M, Baker M, Sutherland R, Greene WC. IL-2-induced tyrosine phosphorylation: IL-2R β is tyrosine phosphorylated. *J Biol Chem* 1990; 265: 3561-7.

130. Turner B, Rapp U, App H, Greene M, Dobashi K, Reed J. IL-2 induces tyrosine phosphorylation and activation of p72-74 Raf-1 kinase in a T-cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1227-31.

131. Cambier J, Justement LB, Newell MK, et al. Transmembrane signals and intracellular "second messengers" in the regulation of quiescent B-lymphocyte activation. *Immunol Rev* 1987; 95: 37-57.
132. Foster PN, Trejdosiewicz LK. Impaired proliferative responses of peripheral blood B cells from splenectomized subjects to phorbol ester and ionophore. *Clin Exp Immunol* 1992; 89: 369-73.
133. Guy GR, Bunce CM, Gordon J, Michell RH, Brown G. A combination of calcium ionophore and 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) stimulates the growth of purified resting B cells. *Scand J Immunol* 1985; 22: 591-6.
134. Evans FJ, Parker PJ, Olivier AR, Thomas S, Ryves WJ, Evans AT, Gordge P, Sharma P. Phorbol esters activation of the isotypes of protein kinase C from bovine and rat brain. *Biochem Soc Trans* 1991; 19: 397-402.
135. Bell RM, Burns DJ. Lipid activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 1991; 266: 4661-4.
136. Evans AT, Sharma P, Ryves WJ, Evans FJ. TPA and resiniferatoxin-mediated activation of NADPH-oxidase. A possible role of Rx-kinase augmentation of PKC. *FEBS Lett* 1990; 267: 253-6.
137. Farago A, Nishizuka Y. Protein kinase C in transmembrane signaling. *FEBS Lett* 1990; 268: 350-4.

138. Ryves WJ, Evans AT, Olivier AR, Parker PJ, Evans FJ. Activation of PKC isotypes alpha, beta 1, gamma, delta and epsilon by phorbol esters of different biological activities. FEBS Lett 1991; 288: 5-9.

139. Merrit JE, Moores KE, Evans AT, Sharma P, Evans FJ, Macphee CH. Involvement of calcium in modulation of neutrophil function by phorbol esters that activate protein kinase C isotypes and related enzymes. Biochem J 1993; 289: 919-26.

140. Moller BK, Andresen BS, Christensen EI, Munck Petersen C. Surface membrane CD4 turnover in phorbol ester-stimulated T lymphocytes. Evidence of degradation and increased synthesis. FEBS Lett 1990; 276: 59-62.

141. Petersen CM, Christensen EI, Andresen BS, Moller BK. Internalization, lysosomal degradation and new synthesis of surface membrane CD4 in phorbol ester-activated T-lymphocytes and U-937 cells. Exp Cell Research 1992; 201: 160-73.

142. Zlotnik A, Ransom J, Fischer M, Frank G, Howard M. IL-4 is a growth factor for activated thymocytes: possible role in T-cell ontogeny. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 3856-60.

143. Ransom J, Fischer M, Mosmann T, Yokota T, DeLuca D, Schumacher J, Zlotnik A. Interferon γ is produced by activated immature mouse thymocytes and inhibits the IL-4-induced proliferation of immature thymocytes. J Immunol 1987; 139: 4102-8.

144. Guidos C, Ransom J, Fischer M, Weissman I, Zlotnik A. Role of interleukin-4 in T-cell ontogeny: Changes in cell surface phenotype and lymphokine production of immature thymocytes after culture with interleukin-4 and phorbol ester. *J Autoimmunity* 1989; 2 (suppl.): 141-53.
145. Sharon N, Lis H. Lectins: cell agglutinating and sugar specific proteins. *Science* 1972; 177: 949-56.
146. Borrebaeck CAK. Detection and characterization of a lectin from non-seed tissue of the *Phaseolus vulgaris* plant. *Planta Med* 1984; 161: 223-8.
147. Kanellopoulos JM, De Petris S, Leca G, Crumpton MJ. The mitogenic lectin from *Phaseolus vulgaris* does not recognize the T3 antigen of human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1985; 15: 479-85.
148. Valentine MA, Tsoukas CD, Rhodes G, Vaughn JH, Carson DA. Phytohaemagglutinin binds to the 20-Kd molecule of the T3 complex. *Eur J Immunol*, 1985; 15: 851-57.
149. O'Flynn K, Krensky AM, Beverley PCL, Burakoff SJ, Linch DC. Phytohaemagglutinin activation of T cells through the sheep red blood cell receptor. *Nature* 1985; 313: 686-91.
150. Lipsky PE, Ellner JJ, Rosenthal AS. Phytohemagglutinin-induced proliferation of guinea pig thymus-derived lymphocytes. I. Accessory cell dependence. *J Immunol* 1976; 116: 868-73.

151. Ceuppens JL, Baroja ML, Lorre K, Van Damme J, Billiau A. Human T cell activation with phytohemagglutinin. The function of IL-6 as an accessory signal. *J Immunol* 1988; 141: 3868-74.
152. Vine JB, Geppert TD, Lipsky PE. T4 cell activation by immobilized phytohemagglutinin: differential capacity to induce IL-2 responsiveness and IL-2 production. *J Immunol* 1988; 141: 2593-600.
153. Lustyik G, O'Leary JJ. Aging and the mobilization of intracellular calcium by phytohemagglutinin in human T cells. *J Gerontol* 1989; 44: B30-6.
154. Schindler D, Kubbies M, Priest RE, Hoehn H, Rabonovitch PS. The phytohemagglutinin response of human peripheral blood lymphocytes as a function of donor age: A reexamination using BrdU-Hoechst flow cytometry. *Mech Ageing Dev* 1988; 44: 253-63.
155. Galindo Villardón MP. Contrastes de hipótesis. En: Exposición intuitiva de métodos estadísticos. Fundamentos y aplicaciones a Biología, Medicina y otras ciencias. Galindo Villardón MP, editor. Salamanca: Gráficas Varona S.L., 1984; 536-55.
156. Calvo F. Pruebas no paramétricas. En: Estadística aplicada. Calvo F, editor. Bilbao: Ediciones Deusto S.A., 1989; 409-44.
157. Gardner MJ, Altman DG. Confidence intervals rather than P values: estimation rather than hypothesis testing. *Br J Med* 1986; 292: 746-50.

158. Ewan PW, Lachmann PJ, McHugh SM, Wilson AB, Deighton J. The profiles of interleukin-2 (IL-2), IL-6 and interferon gammaproduction by peripheral blood mononuclear cells from house dust mite allergic patients: a role for IL-6 in allergic disease. *Allergy* 1994; 49: 751-9.
159. Mori A, Matsuzaki G, Yamamoto K, Kobayashi S, Ito K, Suko M, Okudaira H, Tsuruoka N, Nishizaki Y, Kiminuma O. IL-5 production by CD4+ T cells of asthmatic patients is suppressed by glucocorticoids and the immunosuppressants *FR 506* and ciclosporin A. *Int Immunol* 1995; 7: 449-57.
160. Geha RS, Jabbara HH, Fu SM, Loh RKS, Ren CL. Role of protein tyrosine kinases in CD40 / interleukin-4-mediated isotype switching to IgE. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 784-92.
161. Monteseirín J, Guardia P, Delgado J, Llamas E, Palma J, Conde A, Conde J. Peripheral blood T lymphocytes in seasonal bronchial asthma. *Allergy* 1995; 50: 152-6.
162. Caspi RR, Rizzo LV, DeKruyff RH, Umetsu DT. Regulation of interaction between Th1 and Th2 T cell clones to provide help for antibody production *in vivo*. *Eur J Immunol* 1995; 25: 708-16.
163. Lamb JR, O'Heir RE, Higgins JA, Lake RA. Polyclonal analysis of human CD4+ T-lymphocyte responses to nut extracts. *Immunology* 1995; 84: 91-7.

164. Toogood JH. Risk of anaphylaxis in patients receiving beta-blockers drugs. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81: 1-5.
165. Perlmutter L. IgE regulation during immunotherapy of allergic diseases. *Ann Allergy* 1986; 57: 78-84.
166. Malling HJ, Weeke B. Immunotherapy. Position paper. *Allergy* 1993; 48 (suppl 14): 7-37.
167. Ricci M, Rossi O. Dysregulation of IgE responses and airway allergic inflammation in atopic individuals. *Clin Exp Allergy* 1990; 20: 601-9.
168. Durham SR, Varney V, Gaga M, et al. Immunotherapy and allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* 1991; 21: 206-10.
169. Brunet C, Bédard PM, Lavoie A, et al. Allergic rhinitis to ragweed pollen. I. Reassessment of the effects of immunotherapy on cellular and humoral responses. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 76-86.
170. Kuna P, Alam R, Kumanska B. The effect of preseasonal immunotherapy on the production of histamine-releasing factor (HRF) by mononuclear cells from patients with seasonal asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 816-24.
171. Furin MJ, Norman PS, Creticos PS. Immunotherapy decreases antigen-induced eosinophil cell migration into the nasal cavity. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 27-32.

172. Schulze G, Herrmann F, Neumann C, Meuer S, Bonifer R. Interleukin 5 expressing allergen-specific T-lymphocytes in patients with house dust mite sensitization: analysis at a clonal level. *J Mol Med* 1995; 73: 79-83.

...mines
...oi de

Francisco Javier Monzó Pellido
Modelos Th1 y Th2 de selección in
vita de Citópinos en pacientes polimios.

Apto. Cum laude

21 Febrero 1997

Jue

El Doctorado,

E. Puñtado