

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**VALOR DE LA DETERMINACIÓN DE  
RECEPTORES SOLUBLES DE INTERLEUCINA-2 EN  
CULTIVOS CELULARES, COMO PARÁMETRO DE  
EXPOSICIÓN Y TOLERANCIA ALÉRGICA EN  
PACIENTES ASMÁTICOS EXTRÍNSECOS**

Tesis presentada para optar al grado de  
Doctor en Medicina y Cirugía por:

Miguel Miller Guerrero

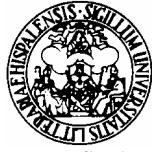
Directores:

Prof. Dr. José Conde Hernández

Dr. D. Francisco Javier Monteseirín Mateo

Sevilla 2005





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

*José Conde Hernández, Profesor Titular de Universidad. Coordinador de la Unidad Docente de Patología General y Propedéutica Clínica y Alergología del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla y Jefe del Servicio Regional de Inmunología y Alergia del Hospital Universitario Virgen Macarena.*

*Certifica: Que el trabajo realizado por D. Miguel Miller Guerrero, “Valor de la determinación de receptores solubles de interleucina-2 en cultivos celulares, como parámetro de exposición y tolerancia alérgica en pacientes asmáticos extrínsecos” ha sido realizado bajo su dirección y codirigido por el Dr. D. Francisco Javier Monteseirín Mateo y plantea una hipótesis y unos objetivos alcanzables, elige un material y método adecuados, presenta unos resultados objetivos, que contrasta adecuadamente en la discusión y llega a unas conclusiones acordes con los resultados, por lo que reúne todos los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.*

*Y para que conste y surta los efectos oportunos expido el presente en Sevilla a cinco de Mayo de Dos mil cinco.*



A mis padres,  
por su ejemplo.

A Eva,  
por su entrega y amor.



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Prof. Dr. D. José Conde Hernández, porque gracias a su apoyo constante, consejo y orientación, me guió en el camino a seguir hasta hacer realidad este trabajo.

Al Dr. D. Francisco Javier Monteseirín Mateo, codirector de esta tesis e impulsor de la línea de investigación que propició este trabajo, por haber puesto a mi alcance los medios necesarios para el desarrollo de esta tesis doctoral.

A todo el Servicio de Alergia del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla, donde se desarrolló este trabajo, por el ánimo y apoyo que me transmitieron durante la elaboración de este trabajo.

A los pacientes que colaboraron en el estudio, porque ellos constituyen el objeto de nuestro quehacer diario.

A todos aquellos que han propiciado la elaboración de este proyecto.





## ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	13
II. INTRODUCCIÓN	15
1. Magnitud del problema del asma	17
1.1. Prevalencia del asma	17
1.2. Tendencias en la severidad del asma	17
1.3. Costos del asma	18
2. Evolución del concepto de asma bronquial	18
3. Técnicas diagnósticas en el asma	20
3.1. Pruebas de función respiratoria	20
3.2. Pruebas inmunoalérgicas	21
3.3. Pruebas histológicas	23
4. Gramíneas	23
5. Inmunoterapia	24
5.1. Generalidades acerca de la inmunoterapia	24
5.2. Tipos de extractos de inmunoterapia	26
5.3. Estandarización de extractos	27
5.4. Pautas de administración de la inmunoterapia específica por vía subcutánea	27
5.5. Modalidades de aplicación de la inmunoterapia específica	28
5.6. Mecanismos de acción de la inmunoterapia	29
5.6.1. Cambios humorales producidos por la inmunoterapia	29
5.6.2. Cambios celulares producidos por la inmunoterapia	30
6. Red celular en el asma	33
6.1. Introducción	33
6.2. Célula presentadora de antígeno	33
6.2.1. Presentación de antígenos	34
6.3. Linfocito T y la red de citoquinas	36

6.3.1. Origen del linfocito T	36
6.3.2. Poblaciones celulares T helper 1 y T helper 2	38
6.3.3. Desarrollo de las subpoblaciones T helper 1 y T helper 2	38
6.3.4. Linfocito T y asma	41
6.4. Macrófagos, células epiteliales y neutrófilos	42
6.5. Linfocitos B como células productoras de IgE	43
6.5.1. Regulación de la síntesis de IgE	44
6.6. Mastocitos	46
6.7. Eosinófilos	48
7. Respuesta asmática inmediata y tardía	50
8. Interleucina 2	52
9. Receptor de interleucina 2	54
10. Receptor soluble de interleucina 2	60
10.1. Caracterización del sIL-2R	60
10.2. Origen del sIL-2R	62
10.3. Función del sIL-2R	63
10.4. Significado clínico del sIL-2R	63
III. JUSTIFICACIÓN	67
IV. OBJETIVOS	73
V. MATERIAL Y MÉTODOS	77
1. Pacientes y controles	79
1.1. Procedencia de los pacientes y centro donde se realizó el estudio	79
1.2. Selección de pacientes y controles	79
1.3. Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes	81
1.3.1. Criterios de inclusión	81
1.3.2. Criterios de exclusión	81
2. Diseño global del estudio	82
3. Registro de síntomas y uso de medicación de rescate	88
4. Test cutáneo	89
4.1. Procedimiento	89

4.2. Antígenos para test cutáneo	91
5. Recogida de muestras sanguíneas	93
6. Determinación de IgE total e IgE específica	93
7. Espirometría	97
8. Protocolo del test de hiperreactividad bronquial con metacolina	97
9. Protocolo del test de provocación inhalativo alergeno específico y del test alergeno inespecífico	100
10. Clasificación según hiperreactividad bronquial	102
10.1. Clasificación según hiperreactividad bronquial inespecífica	102
10.2. Clasificación según hiperreactividad bronquial específica	102
11. Priming	102
12. Cultivos celulares de células mononucleares	103
12.1. Procedimiento	104
12.1.1. Aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica	104
12.1.2. Contaje de células	106
12.1.3. Cultivo de las células	107
12.2. Diseño del ensayo	107
13. Determinación del CD25 soluble	109
13.1. Material	109
13.2. Método	111
13.2.1. Recolección de muestras	111
13.2.2. Preparación de los reactivos	111
13.2.3. Protocolo del ensayo	112
13.2.4. Resultados	113
14. Metodología estadística	113
VI. RESULTADOS	115
1. Introducción al análisis de los resultados	117
1.1. Grupos	117
2. Tablas de pacientes por grupos	119

3. Estadística descriptiva por grupos	127
3.1. Tablas	127
3.2. Figuras	131
4. Estadística analítica	138
4.1. Niveles de sIL-2R antes y durante la estación polínica	138
4.2. Niveles de sIL-2R y provocación bronquial	145
4.3. Diferencias entre respuesta inmediata y dual en la provocación bronquial específica	147
VII. DISCUSIÓN	155
1. Niveles de sIL-2R en el asma bronquial	158
2. sIL-2R e inmunoterapia	167
3. sIL-2R y provocación bronquial	174
3.1. sIL-2R y provocación bronquial específica	175
3.2. sIL-2R y provocación bronquial antígeno inespecífica	178
3.3. sIL-2R y provocación bronquial inespecífica	178
3.4. sIL-2R y respuesta inmediata/dual en la provocación bronquial específica	179
VIII. RESUMEN	185
IX. CONCLUSIONES	195
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	199

## I. ABREVIATURAS

- 15-HETE: ácido 15-hidroxiieicosatetraenoico.
- CD23: FcεRII.
- CD25: IL-2R.
- Célula NK: célula natural killer.
- CPA: célula presentadora de antígeno.
- FcεRI: receptor de alta afinidad para IgE.
- FcεRII: receptor de baja afinidad para IgE.
- FEV<sub>1</sub>: volumen espiratorio en el primer segundo de la espiración forzada.
- FVC: capacidad vital forzada.
- G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos.
- GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos.
- HLA: antígeno linfocitario humano.
- ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1.
- Ig: inmunoglobulina.
- IL: interleucina.
- IL-2R: receptor de interleucina 2.
- IL-2R $\alpha$  : subunidad alfa del receptor de interleucina 2.
- IL-2R $\beta$  : subunidad beta del receptor de interleucina 2.
- IL-2R $\mu$  : subunidad gamma del receptor de interleucina 2.
- IL-4R: receptor de IL-4.
- INF- $\gamma$ : interferón gamma.
- LFA: antígeno de función linfocitaria.
- LT: leucotrienos.
- MCP-1: proteína quimiotáctica del monocito-1.
- MCP-3: proteína quimiotáctica del monocito-3.
- MPI-1 $\alpha$ : proteína inflamatoria del macrófago-1alfa.
- PAF: factor activador de plaquetas.

PC<sub>20</sub> : concentración de agonista broncoconstrictor que provoca una caída del FEV<sub>1</sub> del 20%.

PCE: proteína catiónica del eosinófilo.

PD<sub>20</sub>: dosis acumulada de agonista broncoconstrictor que provoca una caída del FEV<sub>1</sub> del 20%.

PEF: pico espiratorio de flujo.

PHA: fitohemaglutinina.

PG: prostaglandina.

RCT: receptor de la célula T.

sCD25: CD25 soluble.

sIL-2R: receptor soluble de interleucina 2.

sIL-4R: receptor soluble de IL-4.

TGF- $\beta$ : factor transformador del crecimiento.

TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa.

TNF- $\beta$ : factor de necrosis tumoral beta.

VCAM-1: molécula de adhesión vascular-1.

## **II. INTRODUCCIÓN**





## **1. MAGNITUD DEL PROBLEMA DEL ASMA**

### **1.1. PREVALENCIA DEL ASMA**

El asma aparece en todas las razas, pero su prevalencia varía entre el 1% y el 30% según el país. Los estudios epidemiológicos a nivel mundial indican un fuerte aumento de la prevalencia del asma en los últimos 30 años en los países desarrollados<sup>1</sup>, que afecta principalmente a la población de raza blanca con edades comprendidas entre la infancia y adultos jóvenes<sup>2</sup>.

En los Estados Unidos se calcula entre 9 y 12 millones el número de personas afectadas por asma<sup>3</sup>, constituyendo la primera causa de hospitalización en hospitales pediátricos y la sexta causa del total de hospitalizaciones del país. En los países de la Unión Europea, según los datos aportados por el estudio ISAAC<sup>4</sup>, la prevalencia de asma en la población infantil se sitúa entre el 9% (Portugal) y el 32% (Reino Unido), siendo del 10.5% en España. En adultos, existe una mayor prevalencia de asma en los países del norte de Europa, situándose en España entre el 3 y 5%. A partir de estos datos puede deducirse que unos 3-3.5 millones de españoles se encuentran afectados por esta enfermedad.

### **1.2. TENDENCIAS EN LA SEVERIDAD DEL ASMA**

También se ha objetivado un aumento en la severidad de la enfermedad, sugerido por el número de ingresos por asma en los hospitales<sup>5</sup>, aunque recientemente se ha confirmado un descenso en los ingresos hospitalarios, probablemente como resultado del mejor control de la enfermedad por el uso de fármacos antiinflamatorios.

En cuanto a la mortalidad por asma, existen diferencias entre los distintos países. Entre mediados de los años 70 y mediados de los 80, el índice de mortalidad aumentó entre 1.5 y 2 veces en muchos países de todo el mundo<sup>6-7</sup>. El énfasis en el tratamiento antiinflamatorio puede haber jugado un papel destacado en la gradual caída de la mortalidad en algunos paí-

ses como el Reino Unido<sup>8</sup>. En Estados Unidos, la mortalidad se cifra entre 1-1.6/100.000 habitantes, lo que representa unas 5000 muertes por año, habiéndose incrementado la tasa de mortalidad en cerca de un 80% en el periodo 1982-1992. En Nueva Zelanda se sitúa en 6.5 casos/100.000 habitantes. En nuestro país, la tasa de mortalidad por asma se encuentra entre las más bajas de los países desarrollados y es inferior a las de otros países europeos, estimándose en 0.12-0.15/100.000 habitantes/año.

### **1.3. COSTOS DEL ASMA**

Weiss<sup>3</sup>, sobre datos recogidos durante el periodo 1983-1987 y ajustándolos a 1990, estima el gasto causado por el asma en más de 6200 millones de dólares, incluyendo 3600 millones en desembolsos directos en asistencia sanitaria y más de 2500 millones en bajas laborales y ausentismo escolar.

## **2. EVOLUCIÓN DEL CONCEPTO DE ASMA BRONQUIAL**

El término asma, derivado del griego “*ασμα*”, que significa “jadeo”, fue acuñado por Homero hacia el siglo VIII a.C. aproximadamente. Hipócrates (460-377 a.C.) se refiere al asma en su tratado “*Corpus Hipocraticum*”. Areteo de Capadocia (siglo I-II d.C.), figura de la medicina romana, consideró al asma como enfermedad y no como síntoma, relacionándolo con el ejercicio y la aparición de crisis nocturnas. Sir John Floyer, en su “*Treatise of Asthma*” (1698), describió la naturaleza nocturna de esta enfermedad, así como la existencia de diversos factores condicionantes de la enfermedad como la herencia, el tabaco, la ocupación y las emociones. En 1860, Henry Hyde Salter publicó un tratado sobre el asma, en el cual la define como “una disnea paroxística de naturaleza peculiar, generalmente episódica, con respiración satisfactoria entre los episodios”. Además postuló que la estenosis de las vías aéreas era debida a la contracción del músculo liso.

La mayoría de las recientes definiciones de asma vienen derivadas del primer simposium CIBA de 1959<sup>9</sup>, que la definió como “una condición que cursa con estrechamiento de

las vías aéreas con cambios en su severidad en cortos periodos de tiempo, bien espontáneamente o con tratamiento, y que no se debe a enfermedad cardiovascular”. Como podemos observar, esta definición de asma aporta poco a la ya realizada por Salter un siglo antes y es aún deficiente, por no referirse a la inflamación de las vías aéreas, de importancia en la fisiopatología de esta enfermedad.

La definición más actual de asma es la publicada en 1995 tras una serie de trabajos con expertos internacionales, como parte de la Global Initiative for Asthma (GINA), iniciativa de la Organización Mundial de la Salud (WHO) y el Instituto Nacional de la Salud (USA). Se refirieron al asma como: “trastorno inflamatorio crónico de las vías aéreas, con participación de múltiples elementos celulares que incluyen mastocitos, eosinófilos y linfocitos T. En individuos susceptibles, esta inflamación produce episodios recurrentes de sibilancias, sensación de falta de aire, opresión en el pecho y tos, particularmente por la noche o a primera hora de la mañana. Estos episodios se encuentran habitualmente asociados a una importante, aunque variable, obstrucción al flujo aéreo, que es reversible ya sea espontáneamente o con tratamiento adecuado. La inflamación también causa un aumento de la hiperreactividad bronquial a múltiples estímulos”.

Por lo tanto, los tres puntos fundamentales en la enfermedad asmática son: la existencia de inflamación de la vía respiratoria, la hiperreactividad de la vía aérea y la limitación variable al flujo aéreo durante cortos periodos de tiempo. Su historia natural está condicionada por una predisposición familiar a la atopia, una sensibilización precoz durante la época fetal o en la primera infancia, que condicionará la maduración del sistema inmunitario hacia el fenotipo T helper 2, y la existencia de procesos inmunoalérgicos repetidos con infiltrados celulares eosinófilos y el consiguiente desarrollo de la obstrucción bronquial y de las manifestaciones clínicas.

### 3. TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS EN EL ASMA

Se basan en la demostración de la presencia de obstrucción variable de la vía aérea, la cual se puede evidenciar a través de una historia clínica compatible y de la medición de la función pulmonar, habitualmente mediante la espirometría con prueba broncodilatadora y/o la medición ambulatoria del pico de flujo máximo espiratorio (PEF).

#### 3.1. PRUEBAS DE FUNCIÓN RESPIRATORIA

Están orientadas a la objetivación de una obstrucción bronquial reversible. Son la espirometría, la prueba broncodilatadora, la medición del PEF y la provocación bronquial inespecífica.

La espirometría basal consiste en la realización de una espiración forzada tras inspiración máxima, con medición de diferentes volúmenes y flujos.

La prueba broncodilatadora consiste en repetir la espirometría forzada a los 15 minutos de administrar salbutamol o terbutalina inhalada. Se considera positiva si el FEV<sub>1</sub> mejora  $\geq 15\%$  y 200 ml o el aumento de la FVC  $> 10\%$  y 200ml. En los casos en los que no se obtiene resultado se puede administrar un ciclo corto de corticoides sistémicos, que en algunos pacientes pondrá de manifiesto la reversibilidad.

La medida del PEF dos veces al día ayuda a confirmar el diagnóstico de asma, al demostrar la variabilidad diurna. También es útil en el seguimiento del paciente. Variaciones mayores al 20% confirman el diagnóstico de asma. La variabilidad resulta de la siguiente fórmula:

$$\text{Variabilidad} = \frac{(\text{PEF nocturno} - \text{PEF matutino}) \times 100}{(\text{PEF nocturno} + \text{PEF matutino}) / 2}$$

La provocación bronquial inespecífica con tests físicos, metacolina o histamina es útil si la espirometría es normal y la clínica dudosa, y para el asesoramiento de la severidad de la enfermedad. Su positividad indica hiperreactividad bronquial. Hay que tener en cuenta que la hiperrespuesta a los agentes farmacológicos es muy sensible de asma pero no específica. El paciente inhala concentraciones crecientes de un agonista broncoconstrictor, como metacolina o histamina (también pueden utilizarse agentes físicos como el ejercicio, inhalación de suero salino hipertónico, inhalación de aire frío y seco e hiperventilación isocápnica). La espirometría se realiza a intervalos regulares (usualmente 1 y 3 minutos tras la inhalación), y el FEV<sub>1</sub> es medido. La concentración que provoca una caída del FEV<sub>1</sub> del 20% se llama PC<sub>20</sub> (si se refiere a la dosis acumulada del agonista se denomina PD<sub>20</sub>). Se acepta que los valores de PC<sub>20</sub> inferiores a uno previamente definido indican la presencia de una hiperreactividad bronquial. A mayor hiperreactividad de la vía aérea, más baja concentración de broncoconstrictor es requerida para provocar un descenso del FEV<sub>1</sub> del 20%.

### **3.2. PRUEBAS INMUNOALÉRGICAS**

Se utilizan para demostrar el agente etiológico del asma. Son las pruebas cutáneas, la medición de la IgE total y específica y la provocación bronquial específica.

Las pruebas cutáneas se realizan como diagnóstico de la alergia. Valoran la reacción alérgica inmediata, consistente en un habón producido por el aumento de la permeabilidad vascular y el halo eritematoso circundante producido por el reflejo axónico, a los 15 minutos de la aplicación del alérgeno que actúa por un mecanismo IgE al que está sensibilizado el sujeto. El tamaño de la reacción depende del grado de sensibilización al alérgeno, de la cantidad aplicada y de la capacidad individual de los mastocitos para liberar a sus mediadores. La demostración de la sensibilización nos indica que ha existido una exposición al alérgeno, pero no que éste sea necesariamente el causante de la enfermedad, por lo que debe existir una correlación clínica.

Los factores que influyen en la respuesta cutánea son: la zona de la piel (la espalda es más reactiva que el antebrazo), los ritmos circadianos (presentan mayor reactividad por la noche), la edad (son más reactivos los adolescentes y jóvenes) y los fármacos. En referencia a estos últimos, la respuesta está disminuida por el uso de antihistamínicos, ranitidina, fenotiacinas y antidepresivos tricíclicos. Los dos últimos deben suprimirse 10 días antes de la prueba. En cuanto a los antihistamínicos, tienen un efecto variable según la estabilidad de la unión de la molécula al receptor, así el astemizol puede inhibir la respuesta cutánea durante dos meses, el ketotifeno durante un mes, la hidroxicina durante 5-10 días y los de nueva generación durante 3-4 días.

Existen falsos positivos relacionados con la presencia de histamina u otros factores irritantes inespecíficos en el propio extracto alergénico y la existencia de dermatografismo. También hay falsos negativos que se relacionan con el empleo de extractos alergénicos inadecuados, una escasa reactividad cutánea individual o la interferencia de fármacos.

Las contraindicaciones absolutas para su realización son el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes, el embarazo y la enfermedad cutánea generalizada. Son contraindicaciones relativas la historia de anafilaxia grave, el dermatografismo, los síntomas agudizados y el tratamiento con antihistamínicos.

En cuanto a las determinaciones de IgE total y específica, valores de IgE total superiores a 100 U/ml (240 mg/l) suelen considerarse anormalmente altos y apoyar el diagnóstico de asma alérgica.

La provocación bronquial específica se realiza de forma similar a la provocación bronquial inespecífica, pero utilizando extractos alergénicos que pondrán en evidencia el agente etiológico del asma.

### 3.3. PRUEBAS HISTOLÓGICAS

Ponen en evidencia la inflamación bronquial. Consisten en el análisis del esputo y en la fibrobroncoscopia. El análisis del esputo puede hacerse de espontáneo o inducido por suero salino hipertónico<sup>10-11</sup>. La existencia de más del 2% de eosinófilos es sugestiva de asma. A través de la fibrobroncoscopia se puede realizar el lavado broncoalveolar y la biopsia bronquial.

### 4. GRAMÍNEAS

A continuación expondremos algunas consideraciones importantes respecto a las gramíneas por ser el antígeno implicado en nuestro estudio.

El polen de las diversas gramíneas es considerado el principal agente inductor de reacciones de hipersensibilidad tipo I. La familia de las gramíneas (*Poaceae*) es la causa más importante de sensibilización alérgica a pólenes en el conjunto de España, siendo responsable de enfermedad polínica entre el 60% y el 100% según la zona costera o interior<sup>12</sup>, variando la incidencia en el resto de Europa entre el 60% y el 85%.

Botánicamente se han descrito más de 10.000 especies y 650 géneros, constituyendo el 20% de toda la masa vegetal mundial. Pertenecen, dentro del grupo de las Angiospermas, a la familia de las Hierbas.

Según la forma en la que alcancen la cantidad acumulada de calor para su floración, se clasifican en gramíneas de día largo, gramíneas de día corto y gramíneas neutras.

-Gramíneas de “día largo”: requieren para su crecimiento alta pluviosidad y frío, condiciones que se cumplen en los países del norte de Europa y zona agrícola de Norteamérica. Son las gramíneas de floración tardía y que constituyen las praderas naturales. No es propia de nuestra zona. La más representativa es la *Poa pratensis*.

-Gramíneas de “día corto”: son gramíneas de origen tropical, que se caracterizan por florecer con altas temperaturas, siendo la grama la gramínea de crecimiento más rápido.

-Las gramíneas neutras son aquellas que pueden florecer incluso en invierno con días soleados, siendo responsables de síntomas fuera de la época habitual de polinización. Su máximo responsable es la *Poa annua*.

Las especies de gramíneas más importantes en nuestro país tienen su época de polinización mayoritariamente entre los meses de Marzo y Junio. La mayor incidencia de pólenes de gramíneas en nuestra zona ocurre preferentemente desde inicios de Abril hasta la primera quincena de Junio, todo ello variando según las características climáticas de cada año.

Las gramíneas, por su gran extensión vegetal, son la causa más importante de polinosis en el mundo, sin embargo hay otros pólenes que son más alérgicos, como ocurre con el polen de la ambrosia o la *Parietaria judáica*. Se ha estimado, en relación a las gramíneas, que niveles superiores a 50 granos/m<sup>3</sup> de aire son reactivos para los enfermos<sup>13</sup>. En la familia de las gramíneas se ha demostrado una importante reactividad cruzada entre la mayoría de sus especies, tanto silvestres como las cultivadas.

## **5. INMUNOTERAPIA**

### **5.1. GENERALIDADES ACERCA DE LA INMUNOTERAPIA**

El consenso internacional de 1998 define que la inmunoterapia específica “está dirigida a tratar una alergia importante a pólenes, ácaros, epitelio de animales y alternaria y puede evaluarse cuando no es posible eliminar los alérgenos o falla la medicación adecuada en el control de los síntomas de asma. La inmunoterapia específica debe ser realizada sólo por especialistas entrenados en su uso”.



La inmunoterapia constituye el único tratamiento etiológico conocido del asma bronquial IgE dependiente, siendo en la actualidad la única vía para tratar de forma específica e individual un proceso alérgico. Consiste en la administración, a un paciente alérgico, de cantidades crecientes de una vacuna que contiene el alérgeno o los alérgenos frente a los que está sensibilizado, hasta alcanzar una dosis de mantenimiento eficaz. Así, se alcanza un estado de tolerancia frente a los alérgenos y se modifica la respuesta inmunológica del paciente atópico tratado. La duración del tratamiento generalmente está entre 3 y 5 años. La vía general de administración es la parenteral, pero también puede ser a través de las mucosas (oral, sublingual, nasal). La inmunoterapia representa un proceso lento y gradual de inmunizar a un paciente en el que ya se ha instaurado una respuesta inmune anormal, predominantemente IgE, frente a antígenos presentes en el medio.

En 1900 Curtis<sup>14</sup> administró extractos acuosos de ciertos pólenes a sujetos afectados de Fiebre del Heno, obteniendo en los mismos una aparente mejoría clínica. En 1911, Noon<sup>15</sup> realizó los primeros estudios clínicos a este respecto. Se basaba en que la Fiebre del Heno, que estaba causada por una toxina presente en el polen, podría ser neutralizada por una antitoxina específica, producto de la inmunización activa del paciente. Ha sido en los últimos 15 años cuando la eficacia clínica de la inmunoterapia ha sido demostrada en estudios controlados doble ciego/placebo en pacientes seleccionados, de acuerdo con criterios clínicos bien definidos, y utilizando vacunas alérgicas con extractos correctamente estandarizados y caracterizados<sup>16-18</sup>. Diferentes sociedades internacionales de alergia han publicado periódicamente documentos y posturas oficiales sobre el uso de la inmunoterapia como tratamiento curativo de las enfermedades alérgicas<sup>19-23</sup>.

La inmunoterapia específica previene el desarrollo de asma bronquial en pacientes con rinitis e impide nuevas sensibilizaciones en un paciente alérgico<sup>24</sup>. En el año 1999 se publicó un metaanálisis en el que se confirma la utilidad de la inmunoterapia, especialmente en la reducción del consumo de fármacos y en la reducción de la hiperreactividad bronquial específica a los alérgenos<sup>25</sup>. Otro metaanálisis de la *Cochrane Database* del año 2003, con

casi doscientas citas bibliográficas, reafirma la utilidad de la inmunoterapia en la mejora de la hiperreactividad bronquial así como en la reducción de síntomas y del uso de fármacos<sup>26</sup>.

Si la inmunoterapia en décadas pasadas ha tenido detractores por carecer de una base científica idónea y clara que explicara su mecanismo, afortunadamente es precisamente en los últimos 15 años cuando a través de diversos parámetros inmunológicos se han podido demostrar los cambios que induce en la dinámica de las respuestas por hipersensibilidad. Así pues, en el momento actual, paralelamente a la mejoría clínica, dichos parámetros inmunológicos nos reflejan cambios favorables que justifican la buena evolución clínica tras la administración de la inmunoterapia y sobre todo su indicación.

## **5.2. TIPOS DE EXTRACTOS DE INMUNOTERAPIA**

Los extractos utilizados en la inmunoterapia pueden ser:

- Acuosos: necesitan un mayor número de dosis hasta alcanzar la de mantenimiento.
  
- Retardados (depot): Se trata de un extracto de liberación lenta, en una suspensión, absorbidos en hidróxido de aluminio. Este proceder tiene la ventaja que le permite la administración de un número menor de dosis a intervalos mayores.
  
- Modificados: Se trata de un extracto polimerizado llamados alergoide, sometido a modificación química mediante tratamiento con formaldehído, glutaraldehído o alginato para disminuir la alergenicidad del extracto madre conservando su inmunogenicidad.

### **5.3. ESTANDARIZACIÓN DE EXTRACTOS**

Entre finales de los 70 y mediados de los 80 se desarrollaron métodos destinados a la determinación de la actividad alergénica total en unidades con un significado clínico, lo que se conoce por Estandarización Biológica<sup>27-30</sup>. Estos métodos se basan en la preparación de extractos de referencia cuya actividad *in vivo*, expresada en unidades biológicas, se ha determinado por bioensayo en la piel de pacientes alérgicos. Una vez que se dispone de extractos de referencia, la determinación de la actividad de los extractos destinados al uso clínico se hace por comparación con las referencias mediante RAST de inhibición. De este modo, se puede determinar la actividad alergénica, expresada en unidades biológicas/ml, de cualquier extracto siempre que se disponga de una referencia de la misma especie.

La actividad alergénica total de extracto representa la suma de las actividades individuales de los alergenios presentes. Un control adecuado de un producto alergénico requiere no solo el conocimiento de su actividad alergénica total, sino además la determinación de la concentración de los alergenios individuales. Este control se conoce por Estandarización en Unidades de Masa. La Unión Europea exige desde 1993, a los productos alergénicos, la cuantificación del componente activo en unidades biológicas y complementariamente la utilización de unidades de masa para alergenios bien definidos.

### **5.4. PAUTAS DE ADMINISTRACIÓN DE LA INMUNOTERAPIA ESPECÍFICA POR VÍA SUBCUTÁNEA**

La inmunoterapia específica subcutánea, hasta el momento presente, se concibe como un tratamiento a largo plazo. Así, independientemente de cómo se establezca la dosis de mantenimiento, se administra esta misma dosis, a intervalos más o menos largos, durante un periodo de tiempo prolongado, habitualmente de 3 a 5 años. Sin embargo, dependiendo de cómo se administre el extracto alergénico en su fase de iniciación, la inmunoterapia se apellida convencional, agrupada (cluster) o rápida.

La pauta convencional es la más usada. Habitualmente se hacen diluciones 1/10 y 1/100 del extracto de mantenimiento y se comienza con el vial más diluido. Se aplica una sola inyección semanal doblando cada semana la dosis anterior, hasta alcanzar la dosis de mantenimiento (fase de inducción o iniciación), la cual se repetirá mensualmente durante 3-5 años (fase de mantenimiento). Estas pautas convencionales precisan de 12 a 15 semanas. Idealmente, la dosis de mantenimiento debe ser la más alta que tolere el paciente sin producir efectos secundarios (dosis óptima). Habitualmente se utilizan extractos depot.

La pauta rápida (rush) se aplica en régimen hospitalario con dosificación similar a las pautas convencionales pero aplicando las inyecciones cada 30-60 minutos. Se tarda sólo de 1 a 3 días en alcanzar la dosis de mantenimiento. Se emplean extractos acuosos.

La pauta semirrápida o agrupada (cluster) es la administración de varias dosis en un mismo día, con intervalos de 30 minutos entre cada una de ellas y habitualmente cada 3-7 días, con lo que puede alcanzarse la dosis de mantenimiento en 3-4 sesiones. Pueden emplearse tanto extractos acuosos como depot.

## **5.5. MODALIDADES DE APLICACIÓN DE LA INMUNOTERAPIA ESPECÍFICA**

Existen dos modalidades de aplicación de la inmunoterapia: la preestacional y la coestacional (también llamada perenne).

La inmunoterapia preestacional consiste en la aplicación de un extracto alergénico que se inicia y finaliza antes de la época de la polinización. No se aplica durante la estación polínica. Se emplea sólo en caso de hipersensibilidad a pólenes con manifestaciones estacionales. Existen distintas pautas, dependiendo del número de dosis que se apliquen de forma semanal: 3, 4, 7 y 14 semanas.

La inmunoterapia coestacional o perenne es aquella cuya fase de iniciación comienza antes de la época de polinización, alcanzándose el mantenimiento también antes de la esta-

ción polínica. Se aplica durante todo el año, si bien, la dosis de mantenimiento suele reducirse a la mitad en la estación polínica, para volver a aquella tras la fase de polinización. Se utiliza en el caso de pólenes y alérgenos no estacionales, como ácaros, epitelios de animales, etc.

## **5.6. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA INMUNOTERAPIA**

Aunque la inmunoterapia se emplea desde hace años con una eficacia clínica demostrada, su mecanismo de acción no se ha determinado. Esto se debe, en cierta medida, al conocimiento limitado que se tiene de los factores que intervienen en la respuesta inmune alérgica, lo que limita de modo importante el estudio de sus posibles mecanismos de acción. Sin embargo, en los pacientes que han recibido inmunoterapia se pueden detectar una serie de modificaciones clínicas e inmunológicas que parecen reflejar el estado de tolerancia que se induce frente al alérgeno<sup>31</sup>: disminución de la reacción cutánea, abolición de la fase tardía de la reacción alérgica, disminución del grado de hiperreactividad bronquial tanto inespecífica como específica, disminución del número de células inflamatorias en mucosas y de mediadores liberados por estas, desaparición del aumento estacional de IgE, aumento de los niveles de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>4</sub> específica y una reducción de la gravedad y frecuencia del asma y rinitis.

En cuanto a los mecanismos de acción de la inmunoterapia<sup>32</sup>, se sabe que ésta produce cambios humorales y cambios celulares.

### **5.6.1. Cambios humorales producidos por la inmunoterapia**

Respecto a los cambios humorales<sup>33</sup>, en la actualidad se cree que la inmunoterapia podría ejercer sus acciones beneficiosas modificando o regulando en cierta medida la síntesis de IgE. En las fases iniciales de tratamiento se observa un aumento en las concentraciones séricas de IgE alérgeno específica, para producirse posteriormente una disminución gradual de los mismos hasta valores generalmente por debajo de los existentes inicialmente<sup>34</sup>.

No se ha podido establecer una correlación entre los cambios en los niveles de IgE y la mejoría clínica del paciente.

A medida que la inmunización progresa, la concentración de IgG<sub>4</sub> alérgeno específica suele aumentar muy significativamente, y en algunos estudios se correlaciona con la mejoría clínica del paciente. Se han propuestos diversos mecanismos para explicar el papel beneficioso de la IgG<sub>4</sub>. La hipótesis más extendida es que la IgG<sub>4</sub> actuaría como un anticuerpo bloqueante impidiendo la unión del alérgeno a la IgE específica que se encuentra sensibilizando al mastocito<sup>35-36</sup>. En un estudio que incluyó pacientes que recibieron inmunoterapia con veneno de himenópteros, apicultores que toleraban las picaduras y enfermos sensibilizados, que no habían recibido aun inmunoterapia, se observó la presencia de autoanticuerpos en la mayoría de los apicultores y en los pacientes tratados con inmunoterapia y, su ausencia en los pacientes que no habían recibido inmunoterapia<sup>37</sup>. Sin embargo, para otros autores, la presencia de estos autoanticuerpos puede ser solo un epifenómeno dentro del contexto del cambio de perfil de secreción de citoquinas de los pacientes tratados con inmunoterapia<sup>38</sup>.

En los pacientes tratados también se produce un aumento de la IgA a nivel de la mucosa respiratoria.

### **5.6.2. Cambios celulares producidos por la inmunoterapia**

Los cambios celulares producidos por la inmunoterapia se observan tanto en la célula T como en las células efectoras.

Una de las hipótesis más aceptadas sugiere que por acción de la inmunoterapia se produciría un cambio en el perfil de secreción de citoquinas por parte de los linfocitos T helper 2. Este cambio podría estar causado porque la inmunoterapia induciría una tolerancia alérgeno específico de estos linfocitos T helper 2/T helper 0 (anergia) o porque daría lugar a la aparición de nuevas clonas de células T helper 1 alérgenos-específico (desviación inmu-

ne)<sup>39-40</sup>. Este cambio de perfil secretor se manifestaría con un aumento de los niveles de IgG específica, IgG<sub>4</sub>, IgM e IgA, cuya síntesis es favorecida por las interleuquinas secretadas por las células T helper 1. En el ámbito experimental se ha observado en pacientes que recibieron inmunoterapia con polen de gramíneas un cambio en el perfil de secreción, manifestado por un aumento en la producción de INF- $\gamma$ -mRNA, INF- $\gamma$ , IL-2 y un descenso de IL-4<sup>41-42</sup>.

La razón de este cambio en el patrón de respuesta se desconoce, aunque parecen ir ligadas al diferente tipo de inmunización en cada caso (natural frente a inmunoterapia). La exposición natural ocurre generalmente por vía mucosa mientras que en la inmunoterapia el tratamiento se administra de forma subcutánea. Además, la concentración de antígeno que se suministra durante la inmunoterapia es mucho mayor que en su exposición natural. Se ha sugerido que estas diferencias podrían implicar cambios en la presentación antigénica y/o en la producción de ciertas citoquinas necesarias para generar respuestas T helper 2 o T helper 1<sup>43</sup>. En este sentido, estudios in vitro indican que el tipo de célula presentadora en uno y otro caso depende de la concentración de alérgeno disponible. Así, a mayor concentración la presentación la realizarían células inductoras de respuestas T helper1 y viceversa. Como la concentración del alérgeno en su exposición natural es relativamente baja se favorecería la respuesta T helper 2. Por el contrario, altas dosis de alérgeno administradas de forma local podrían favorecer la respuesta T helper 1 observada tras la inmunoterapia.

Otra variación inmunitaria observada es la aparición de células supresoras específicas<sup>32</sup>.

La inmunoterapia también actúa en las células efectoras de la respuesta alérgica, mastocitos y eosinófilos, reduciendo el reclutamiento de células inflamatorias, su activación y la liberación de mediadores. Creticos<sup>44</sup> estudió la repercusión de la inmunoterapia a nivel de las células efectoras liberadoras de mediadores. Demostró que en la provocación nasal con antígeno, el grupo de enfermos tratados con inmunoterapia respondía requiriendo mayores dosis para producir síntomas o liberar mediadores que los controles no tratados, siendo la

cantidad de mediadores que se liberaban significativamente menor en los enfermos tratados que en los no tratados.

Se ha observado un descenso del número de mastocitos en la mucosa nasal y epitelio tras inmunoterapia con neumoalergenos, así como también un descenso en los niveles de histamina y PGE<sub>2</sub> en las secreciones nasales después de la provocación con alérgeno<sup>45</sup>.

Se ha descrito la existencia de inhibiciones en el incremento estacional de eosinófilos y en la actividad quimiotáctica de los mismos en sangre periférica y líquido de lavado broncoalveolar tras la inmunoterapia<sup>46</sup>, así como la disminución en el número de estas células que infiltran la mucosa nasal durante la estación polínica.

Gran parte de los efectos de la inmunoterapia sobre los mastocitos y eosinófilos son el resultado de las modificaciones descritas en la célula T. En este sentido, sabemos que la inmunoterapia induce la diferenciación de forma preferente de los linfocitos de tipo T helper 2 en linfocitos T helper 1, lo que conlleva un cambio en el perfil de secreción de citoquinas. Este cambio de perfil en la producción de citoquinas produce una inhibición en la síntesis de IgE dependiente de IL-4<sup>47</sup> y una reducción de la activación de los mastocitos, lo cual produce una disminución en la liberación de mediadores implicados en la reacción alérgica. La reducción en la producción de IL-5 disminuye la actividad de los eosinófilos, produciendo una menor inflamación y destrucción tisular<sup>20</sup>.

Al disminuir la liberación de mediadores, la inmunoterapia puede reducir la necesidad de fármacos y originar un descenso en la morbilidad y mortalidad del asma, aumentando la calidad de vida de los pacientes asmáticos.

Los efectos terapéuticos conseguidos por la inmunoterapia estarían relacionados con el incremento inicial y la disminución progresiva de los anticuerpos IgE, la supresión de la elevación transitoria de la IgE durante la exposición alérgica estacional, la elevación de los anticuerpos IgG frente al antígeno inyectado, la disminución de la sensibilidad de los basófi-



los al antígeno expuesto y la disminución de la proliferación de linfocitos y linfocinas frente al antígeno.

## **6. RED CELULAR EN EL ASMA**

### **6.1. INTRODUCCIÓN**

Aunque la base inflamatoria del asma está bien establecida, los mecanismos de la misma permanecen incompletamente comprendidos. Al observar las biopsias de pulmones asmáticos observamos la presencia de células inflamatorias en la vía aérea, independientemente de la gravedad clínica del proceso<sup>48</sup>.

La inflamación de la vía aérea comprende una compleja red de interacciones entre células inflamatorias, células estructurales y sus mediadores, donde se define a los mastocitos y eosinófilos como las células efectoras, y a los linfocitos T como las células organizadoras de su función. El hecho más destacado del asma es la infiltración mucosa por eosinófilos activados, por lo que se ha referido al asma como “bronquitis descamativa eosinófila”. Es de interés resaltar que, junto a las células inflamatorias, las células estructurales, tales como epiteliales, endoteliales y fibroblastos, juegan un papel activo en la compleja red celular.

Como consecuencia de la inflamación crónica en la vía aérea, se producen cambios en las mismas, los cuales incluyen daño epitelial, aumento del depósito de colágeno debajo de la membrana basal<sup>49</sup>, angiogénesis, hipertrofia del músculo liso e hipertrofia de glándulas mucosas. Es lo que se define como remodelado de las vías aéreas<sup>48</sup>.

### **6.2. CÉLULA PRESENTADORA DE ANTÍGENO**

La presentación de antígenos en el pulmón es realizada principalmente por las células dendríticas<sup>50</sup>, localizadas en el epitelio de las vías aéreas, donde forman una red interdi-

gital<sup>51-52</sup> idealmente localizada para la captura de antígenos inhalados. Su capacidad de presentación antigénica es 4 a 8 veces mayor que la de los macrófagos alveolares. La densidad de población de células dendríticas intraepiteliales es mantenida por el balance entre el reclutamiento de células de la sangre periférica y su emigración a los tejidos linfoides secundarios. En respuesta a un estímulo antigénico, la densidad de células dendríticas intraepiteliales aumenta rápidamente de forma transitoria. Posteriormente migran para presentar los antígenos a las células T en los tejidos linfoides secundarios.

### **6.2.1. Presentación de antígenos**

La presentación del alérgeno por la CPA requiere varios pasos: 1) captura del alérgeno por la CPA (al estar los antígenos constituidos por proteínas o glucoproteínas, al entrar en contacto con la mucosa bronquial se solubilizan, atravesando la capa epitelial y estableciendo contactos con las CPA), 2) procesamiento (proteólisis en fragmentos peptídicos) dentro de la célula<sup>53</sup>, 3) asociación de los fragmentos con las moléculas del HLA en vesículas intracelulares encargadas del transporte a la superficie celular, 4) exteriorización del complejo antígeno-HLA en la superficie de la CPA y 5) presentación del antígeno a los linfocitos T (interacción CPA-linfocito T).

La interacción CPA-Linfocito T consta de dos señales<sup>54-55</sup>:

1) Interacción entre el complejo antígeno-HLA de la CPA y el receptor antigénico del linfocito T (RCT), el cual se encuentra asociado a la molécula de superficie CD3 (RCT-CD3). El RCT es un complejo formado por dos moléculas no asociadas covalentemente, las cadenas polipeptídicas  $\alpha$  y  $\beta$  (que son los receptores específicos del antígeno procesado), y el complejo CD3 (responsable de transmitir las señales al linfocito cuando se establece la unión con la CPA). La molécula CD4, situada en la membrana del linfocito T es la encargada de ser el receptor linfocitario del HLA de la CPA.

2) Interacción entre un número de moléculas de superficie celular accesorias, presentes en ambas células, las cuales se reconocen entre sí específicamente y participan en el proceso de coestimulación celular. Entre estas se encuentran las moléculas de adhesión intercelular, cuyo objetivo es aumentar la fuerza de unión entre las células, que presentan una dificultad de acercamiento al establecerse cargas negativas repulsoras entre ambas debido a la composición glicoproteica de sus membranas. En el linfocito se encuentran las moléculas de adhesión LFA y en las CPA las ICAM-1<sup>56</sup>. Otras moléculas complementarias son la CD28 en el linfocito T y la B7 (CD80/CD86) en la célula dendrítica. Además, la CPA puede liberar mediadores solubles que modulan la respuesta celular T, así la IL-1 liberada por la CPA actúa en el linfocito T induciendo la síntesis de IL-2 y la expresión del IL-2R<sup>57</sup> (Figura 1).

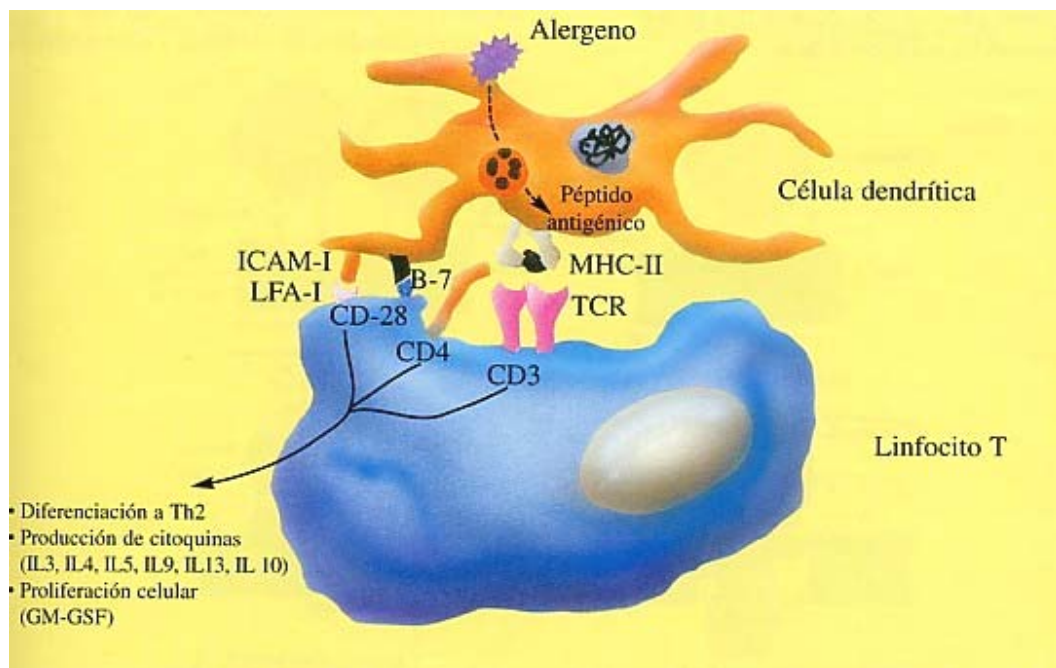


Figura 1: Presentación antigénica. Tomado de Naberan HX. El proceso inflamatorio del asma y sus implicaciones clínicas. DIMECO Enero 1999:2-10.

La interacción entre la CPA y el linfocito T durante la presentación antigénica determina no sólo la amplitud de la activación del linfocito T, sino también el fenotipo diferenciado de la célula T. Las CPA inducen la respuesta primaria de las células T helper 0 a nuevos antígenos. Sin embargo, el grado en que las CPA participan en la respuesta secundaria de las células T de memoria a un antígeno, y si son capaces de presentar el antígeno a las células T de memoria dentro de la vía aérea, no está aclarado.

En ausencia de actividad local dendrítica, la presentación del antígeno durante la respuesta inmune secundaria puede ser realizada por los linfocitos B. Otras células presentes en la vía aérea, incluyendo células estructurales como las células epiteliales, tienen HLA y pueden ser capaces de realizar alguna de las funciones de CPA.

### **6.3. LINFOCITO T Y LA RED DE CITOQUINAS**

#### **6.3.1. Origen del linfocito T**

El linfocito T juega un papel fundamental en la regulación y coordinación de la respuesta inmune. Los precursores de los linfocitos T se originan en la médula ósea, migrando después y madurando en el timo. La maduración del linfocito T es un proceso complejo, con diversos estadios intermedios, que pueden ser estudiados gracias a la expresión escalonada de distintos receptores en su superficie que definen cada etapa.

De la migración de células primordiales linfoides desde el torrente sanguíneo al timo surgen los linfocitos tímicos o timocitos. Estos se organizan en lóbulos, con formación de una médula y una corteza, donde tiene lugar la maduración del linfocito T. A lo largo de su diferenciación, los timocitos van modificando determinadas estructuras de su superficie, que podemos reconocer con anticuerpos monoclonales y que han sido llamados antígenos de diferenciación e identificados por las siglas CD seguidas por un número (*cluster of differentiation*: grupo de diferenciación). El 95% de los linfocitos T maduros expresan el receptor antigénico del tipo TCR-2 (heterodímero de dos polipéptidos,  $\alpha$  y  $\beta$ , unidos por puentes di-

sulfuro) y alrededor del 5% de los linfocitos T maduros expresan el TCR-1 (estructuralmente similar al TCR-2, pero siendo los polipéptidos distintos, cadenas  $\gamma$  y  $\delta$ ).

En el primer estadio, el timocito precoz expresa en su superficie los marcadores CD7, CD2, CD5, CD38 y el receptor de transferrina (CD71). Además, expresa en el citoplasma la molécula CD3 (complejo proteico asociado al TCR).

Los timocitos intermedios o de estadio II, se caracterizan por la aparición de marcadores de superficie adicionales, tales como CD1, y por la expresión simultánea de CD4 y CD8 en la misma célula (son las llamadas *células doblemente positivas*). En esta fase, comienza la expresión de TCR  $\alpha$ - $\beta$  en la superficie celular, asociadas al polipéptido del complejo antigénico CD3.

Durante el estadio III, los timocitos pierden el CD1 y el receptor de transferrina. Estos timocitos maduros presentan en su membrana celular la molécula CD3 asociada al TCR-2 (formando el complejo receptor del linfocito T) y expresan ya los marcadores CD4 o CD8 que permiten su diferenciación en dos subclases de linfocitos T. Así, los linfocitos maduros que conservan el CD4 tienen TCR con capacidad para reconocer antígenos asociados al HLA clase II (linfocitos T helper o cooperadores), y los que conservan CD8 tienen TCR que reconoce antígenos asociados al HLA clase I (linfocitos T supresores/citotóxicos).

Una vez que los linfocitos T han madurado, pueden responder a los antígenos para los cuales son específicos, regulando la respuesta inmune y actuando como células efectoras. Las células T maduras recién generadas por el timo tienen un enorme potencial de reconocimiento de antígenos diferentes. Su circulación se restringe básicamente entre la sangre y tejidos linfáticos como el bazo, las amígdalas y los nódulos linfáticos, regiones anatómicas donde encontrarán al antígeno para el cual son específicas. Una vez se produce el primer encuentro de la célula T con el antígeno, ésta se activa, dejando de ser virgen y pasando a ser memoria. La célula T activada memoria ya es capaz de producir un amplio perfil de citoquinas, a diferencia de la célula T virgen, que básicamente produce IL-2. La circulación de

las células T memoria no solo abarca tejidos linfáticos sino cualquier tejido no linfático como la piel y mucosas, es decir, zonas de entrada y persistencia del antígeno, donde estas células son atraídas y retenidas.

### **6.3.2. Poblaciones celulares T helper 1 y T helper 2<sup>58</sup>**

Cuando los linfocitos T son activados se produce su diferenciación en subpoblaciones T helper 1 y T helper 2 a partir de la célula T helper 0. Las investigaciones han resuelto en agrupar las citoquinas en 2 tipos principales: T helper 1 y T helper 2, en base al tipo de linfocito T helper que las produce<sup>59</sup>.

En la actualidad se cree que la adquisición del perfil de citoquinas T helper 1 o T helper 2 tiene lugar durante la presentación del antígeno por parte de las células dendríticas a la célula T *naïve* (virgen) y que algunos factores presentes en el medio donde se produce esta activación, el tipo de antígeno presentado y la predisposición genética del individuo, van a condicionar la diferenciación hacia células T memoria helper 1 o helper 2.

Las subpoblaciones mejor definidas de células T helper son las llamadas T helper 1 y T helper 2, siendo INF- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\beta$  las principales citoquinas de las células T helper 1 (promueven la inmunidad celular y la producción de anticuerpos IgG) e IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, de las células T helper 2 (potencian la producción y actividad de los eosinófilos y mastocitos<sup>60</sup>, y aumentan la síntesis de IgE). Algunas citoquinas como el GM-CSF, la IL-3 y el TNF- $\alpha$ , son producidas por ambas subpoblaciones<sup>61-63</sup>.

### **6.3.3 Desarrollo de las subpoblaciones T helper 1 y T helper 2**

Las subpoblaciones T helper 1 y T helper 2 se desarrollan a partir del linfocito T helper 0, y la diferenciación hacia una subpoblación viene determinada por los estímulos presentes durante la respuesta inmune, de manera que las citoquinas producidas en la fase temprana de la respuesta inmunitaria influyen en la diferenciación funcional de las células T

CD4. De este modo, la IL-12 es el principal inductor de las células T helper 1, y la IL-4, de las células T helper 2<sup>64</sup>. La IL-12 induce el desarrollo a T helper 1 e inhibe el desarrollo a T helper 2, mientras que IL-4 estimula el desarrollo hacia T helper 2 e inhibe el desarrollo hacia T helper 1<sup>65</sup>.

La diferenciación de las células T CD4 activadas por antígeno hacia células T helper 1 efectoras es la respuesta a microbios que infectan o activan macrófagos y a aquellos que activan células NK. Son ejemplos las bacterias intracelulares como *Listeria* y micobacterias, los parásitos y los virus. Un hecho común de todas estas infecciones es la producción de IL-12 durante la respuesta inmune innata. La IL-12 se une a receptores de la célula T CD4, activando la vía STAT4 e induciendo la diferenciación de la célula T en T helper 1. Los interferones, como el INF- $\gamma$ , promueven el desarrollo hacia T helper 1 por medio de la estimulación de la producción de IL-12 por los macrófagos y la expresión de receptores de IL-12 en los linfocitos T.

La diferenciación de las células T CD4 activadas por antígeno hacia células T helper 2 efectoras acontece como respuesta a helmintos y alérgenos, los cuales pueden causar estimulación crónica de las células T, habitualmente con poca activación de macrófagos. La diferenciación hacia células T helper 2 es dependiente de IL-4, el cual actúa activando STAT6, factor de transcripción de IL-4 y otros genes de citoquinas T helper 2 (Figura 2).

El obligatorio papel de la IL-4 en la diferenciación T helper 2 causa un obvio problema: como las células T helper 2 diferenciadas son la principal fuente de IL-4 durante la respuesta inmune a proteínas antigénicas, ¿de dónde procede la IL-4 antes de la diferenciación a T helper 2? Una posible explicación es que las células T helper CD4 estimuladas por el antígeno secreten pequeñas cantidades de IL-4 desde su activación inicial. Si el antígeno es persistente y está presente a grandes concentraciones, la concentración local de IL-4 aumenta rápidamente. Si además el antígeno no causa inflamación que dé lugar a producción de IL-12, el resultado es una mayor diferenciación hacia T helper 2. En algunas situaciones,

la IL-4 producida por otras células como los mastocitos, basófilos y eosinófilos puede contribuir al desarrollo hacia T helper 2.

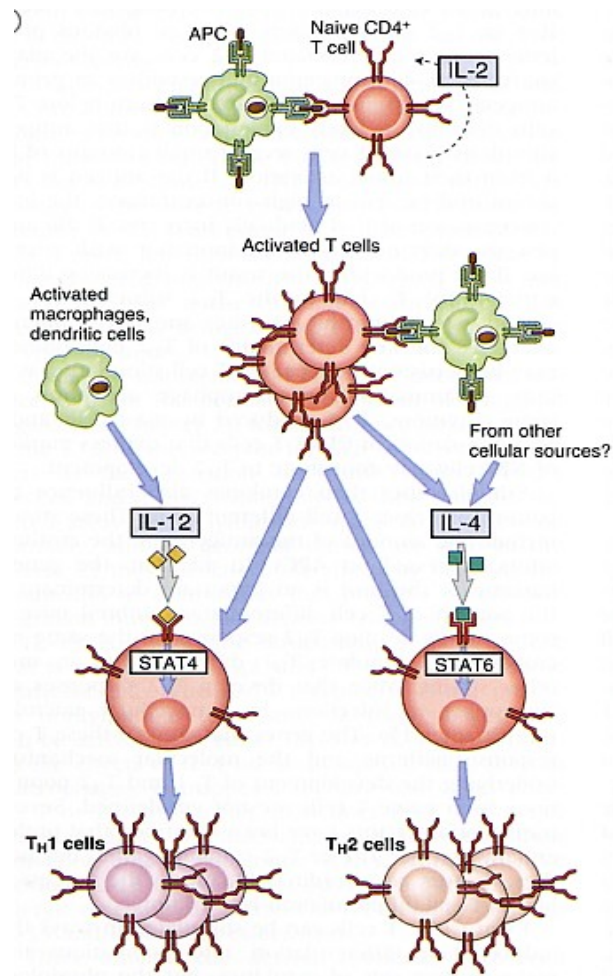


Figura 2. Diferenciación T helper 1 y T helper 2. Tomado de Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Effector mechanisms of immune responses. En: Abbas A, Lichtman A, Pober J, eds. Cellular and molecular immunology, 4ª ed. Philadelphia: Saunders, 2000;255-258.



#### 6.3.4. Linfocito T y asma

Los linfocitos T son considerados las células centrales en el asma, ya que son las responsables de dirigir la respuesta inflamatoria alérgica<sup>66</sup>. Tras la presentación del antígeno por la CPA, el linfocito T se activa, expresando un número de marcadores de activación en su superficie celular, de los cuales los más estudiados son el IL-2R (o CD25) y el HLA-DR. Gerblich<sup>67</sup> descubre que tras una provocación antigénica en asmáticos, se produce un descenso a las 48 horas de la población helper en sangre periférica, advirtiendo así mismo un incremento estadísticamente significativo en el lavado broncoalveolar de la población T CD4, sin detectar apenas alteraciones en la población T CD8, logrando probar que la población helper desciende en sangre al ser reclutada por el pulmón. Wilson<sup>68</sup> y Corrigan<sup>69</sup> demuestran, mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales fluorescentes contra marcadores de activación de la superficie celular T, como el IL-2R y el HLA DR, que los linfocitos están en un estado de activación en las vías aéreas de los asmáticos cuando se comparan con los de controles no atópicos. Durante las exacerbaciones severas de asma, un aumento en la activación celular T puede ser detectado en sangre periférica por la medición de IL-2R soluble, secretado por las células activadas.

En los individuos sanos existe un equilibrio entre las citoquinas T helper 1 y T helper 2, mientras que en las enfermedades alérgicas, la síntesis de citoquinas está orientada hacia la producción del tipo T helper 2<sup>70-73</sup>.

Los estudios más recientes apuntan a que ya existe una respuesta inmune fisiológica tipo T helper 2 en el feto<sup>74</sup>, que es favorecida por los factores solubles segregados por la placenta (progesterona, PGE<sub>2</sub>, IL-4, IL-10)<sup>75-76</sup>. Este hecho parece ser universal y no solamente en aquellos individuos que posteriormente desarrollarán una patología alérgica. A partir del nacimiento, y consecuentemente expuesto el recién nacido al contacto masivo con antígenos ambientales, se pueden producir dos situaciones: o bien se desvía la respuesta inmune principalmente hacia una respuesta T helper 1 (propia de los individuos no alérgicos),

o bien persiste la respuesta inmune tipo T helper 2, la cual caracteriza a los pacientes con asma bronquial alérgica.

A través de las citoquinas, las células T helper 2 coordinarán la reacción inmune mediada por IgE, eosinófilos y mastocitos. La IL-4 estimula la síntesis de IgE<sup>65</sup>. La IL-5 promueve la diferenciación terminal del precursor de eosinófilo, su reclutamiento<sup>77-78</sup> y potencia la capacidad efectora de los eosinófilos maduros<sup>79-81</sup>. La IL-5 y GM-CSF prolongan la supervivencia del eosinófilo al inhibir la muerte celular programada<sup>82-83</sup>. La IL-13 contribuye a la fisiopatología del asma por virar el sistema inmune hacia la producción de IgE<sup>84</sup>, aumentar la expresión de la VCAM-1 en las células endoteliales, facilitando así la unión del eosinófilo a través de su ligando VLA-4, y disminuir la expresión de citoquinas T helper 1.

#### **6.4. MACRÓFAGOS, CÉLULAS EPITELIALES Y NEUTRÓFILOS**

Los macrófagos se localizan tanto en la luz como en la mucosa de las vías aéreas. Los monocitos sanguíneos de los cuales derivan saldrán de los capilares peribronquiales y, en el tejido conectivo bronquial subepitelial, se transformarán en macrófagos.

Los macrófagos tisulares son la fuente principal de mediadores en la inflamación crónica. Producen leucotrienos, que contribuyen al broncoespasmo, y sintetizan el GM-CSF y la MCP-1, las cuales son quimiotácticas de los macrófagos y activadoras de citoquinas, siendo así capaces de amplificar su propia actividad y reclutamiento por vía autocrina o paracrina. La liberación de IL-1 y TNF- $\alpha$  amplifica la respuesta inflamatoria por la activación de otras células, especialmente del epitelio bronquial y del endotelio, de manera que la activación de las células endoteliales facilita el reclutamiento de monocitos al tejido conectivo bronquial, y la activación de las células epiteliales facilita la migración de los macrófagos a través del epitelio, permitiéndoles alcanzar la luz bronquial. A su vez, el epitelio produce elevados niveles de MCP-1<sup>85</sup> y GM-CSF<sup>86</sup> que actuará en los macrófagos completando un feed-back positivo que probablemente amplifique los efectos más allá<sup>87</sup>.

El epitelio bronquial también produce interleucinas quimiotácticas de eosinófilos y neutrófilos como la IL-6 e IL-8, endotelinas, que estimulan a las células musculares y la secreción glandular mucosa, y metabolitos del ácido araquidónico<sup>88</sup> como las PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub>α, de potente acción vasoconstrictora.

El papel de los neutrófilos en el asma bronquial es una cuestión que permanece abierta. Se ha observado un aumento significativo del porcentaje de neutrófilos en el lavado broncoalveolar y moco bronquial de individuos que experimentan reacción de fase tardía tras la agresión antigénica. Este aumento de neutrófilos tiene el potencial de desencadenar lesiones titulares significativas a través de la liberación de proteasas, cationes, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y PAF<sup>89</sup>.

Nuestro grupo presentó la primera evidencia de que los neutrófilos son capaces de estimularse específicamente por el alérgeno al cual los pacientes son sensibles, por lo que pueden ser atraídos al foco en el cual se desarrolla la reacción alérgica, directamente por la acción del alérgeno sin que tengan que servir de intermediarias otras células<sup>90</sup>.

## **6.5. LINFOCITOS B COMO CÉLULAS PRODUCTORAS DE IgE**

En 1916, Coca y Cooke describieron la frecuente asociación del asma con la rinitis y el eczema. Como estas enfermedades solían presentarse en varios miembros de una misma familia, se sospechó que existía una predisposición hereditaria, a la que se denominó atopia. Posteriormente Ishizaka descubrió en el suero de algunos de estos enfermos una sustancia que se denominó *reagina*, comprobándose en 1966 que se trataba de la IgE. La IgE es la responsable de las reacciones de tipo inmediatas y a las personas que sufrían este tipo de reacciones se las denominó atópicas. En la actualidad, la atopia se considera una condición hereditaria caracterizada por una respuesta inmunológica excesiva, debida a la producción elevada de IgE frente a sustancias del medio ambiente, que está caracterizada por un aumento de la IgE total, tests cutáneos positivos a estos comunes aeroalergenos, y la presencia de IgE específica de alérgeno en el suero. La importancia de la IgE, tanto en el asma atópico

como no atópico, se deriva de la existencia de una fuerte correlación observada entre los niveles séricos de IgE y la probabilidad de desarrollar asma<sup>91</sup>.

### **6.5.1. Regulación de la síntesis de IgE**

Inicialmente, las células del sistema inmune innato encuentran diversos antígenos, activándose la síntesis y secreción de citoquinas por estas células y la endocitosis del antígeno por las CPA. Tras la presentación del antígeno a los linfocitos T helper 0 se produce la diferenciación celular T. Los linfocitos T helper 2 secretan IL-4, IL-6 e IL-10. La IL-10 suprime el desarrollo hacia T helper 1 y la IL-4 es esencial para la síntesis de IgE<sup>92</sup>. De la interacción celular T-B se derivará un cambio del isotipo de los anticuerpos producidos, produciendo IgE. La interacción celular B-T consta de las siguientes fases<sup>93-95</sup>:

-Unión del antígeno a la inmunoglobulina de superficie IgM específica del antígeno en la superficie celular B.

-Procesamiento del antígeno.

-Presentación del antígeno, en el contexto de la molécula HLA presente en la célula B, a una célula T helper 2 específica del alérgeno.

-Reconocimiento del antígeno por el receptor de la célula T (complejo TCR/CD3), lo cual activa la expresión del ligando de CD40 (CD40L) en la superficie celular T.

-Interacciones entre moléculas complementarias expresadas en la superficie celular T y B:

+La molécula CD40, constitutivamente expresada en la superficie celular B, se une a CD40L de la célula T, lo cual conduce a la expresión de la molécula B7 en la célula B.

+Unión de CD80/CD86 a la molécula CD28 de la célula T, lo cual induce la secreción de IL-4 por esta última.

-Unión de IL-4 a su receptor (IL-4R), presente en la superficie celular B. La célula B ha recibido así las dos señales requeridas para el cambio de isotipo a IgE: La IL-4 desencadena la transcripción de la región  $\epsilon$  (cadena pesada de IgE), y el entrecruzamiento entre CD40 y CD40L activa la recombinación del DNA con esa región, resultando en el cambio al isotipo IgE y en la transformación a célula plasmática secretora de la misma<sup>65, 96</sup>.

Durante la respuesta inmune, el linfocito B puede expresar diferentes isotipos de cadenas pesadas de inmunoglobulinas compartiendo la misma región VDJ de los genes de inmunoglobulinas. Este proceso denominado “*isotype switching*” (o cambio de isotipo) permite a un simple clon de células B producir distintas clases de anticuerpos con la misma especificidad, la cual viene determinada por la región variable codificada por la región V, pero con diferentes funciones efectoras. De relevancia en la atopia es el cambio del isotipo IgM a IgE.

Para cambiar a un particular isotipo, una célula B necesita dos señales: La primera señal es citoquina dependiente, resultado de la activación de la transcripción en una región específica del locus de inmunoglobulina, que dicta una especificidad isotípica; la segunda señal es dependiente de la molécula CD40, expresada en la superficie celular B, que activa la maquinaria de recombinación del DNA.

El cambio de isotipo de inmunoglobulinas es por tanto el resultado de un proceso de recombinación del DNA que yuxtapone diferentes genes  $C_H$  (de cadenas pesadas, que da el tipo de isotipo) a los expresados genes VDJ (que dan la especificidad antigénica). El cambio de isotipo está dirigido por las citoquinas en conjunción con la regulación de la proliferación y diferenciación de las células B a célula plasmática.

## 6.6. MASTOCITOS

Los mastocitos se localizan tanto en el epitelio como en la mucosa bronquial. En los sujetos no asmáticos constituyen menos del 1% de las células nucleadas obtenidas por lavado broncoalveolar, y este número aumenta hasta un 3-5% en los sujetos asmáticos<sup>97-98</sup>.

Los mastocitos y basófilos presentan en su superficie receptores para la molécula de IgE, que unen IgE con alta afinidad (FcεRI)<sup>99</sup>. Existe otro receptor de baja afinidad para IgE (FcεRII o también llamado CD23), presente en la superficie de linfocitos B, monocitos-macrófagos, eosinófilos, plaquetas, células NK y linfocitos T activados<sup>100</sup>. La unión de un antígeno bivalente o polivalente (dos o más lugares de unión con su anticuerpo específico) con un mínimo de dos moléculas de IgE correspondiente, ligadas al mastocito, produce la activación del mismo.

La activación del mastocito produce la rápida liberación de mediadores preformados almacenados en los gránulos citoplasmático, así como la activación de la síntesis de novo de nuevos mediadores derivados del metabolismo del ácido araquidónico.

Entre los mediadores preformados se encuentran la histamina, las proteasas neutras como la tryptasa y la quimasa, la heparina, los proteoglicanos y la carboxipeptidasa A. A los pocos minutos de una estimulación antigénica en un paciente asmático alérgico se produce una elevación plasmática de histamina y la eliminación de sus metabolitos en orina<sup>101</sup>. La histamina produce contracción del músculo liso bronquial y gastrointestinal, aumento de la secreción de moco, vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular y de las barreras epiteliales. La quimasa es broncoconstrictora. La tryptasa provoca el reclutamiento y la activación del eosinófilo, la proliferación epitelial y del músculo liso bronquial y la liberación de componentes del complemento.

Los mediadores de nueva síntesis son derivados del metabolismo del ácido araquidónico, el cual, tras la activación del mastocito, es liberado a partir de los fosfolípidos de membrana por la enzima fosfolipasa A<sub>2</sub>. El ácido araquidónico es metabolizado por dos vías principales:

-Vía de la ciclooxigenasa: sintetiza prostaglandinas y tromboxano. Las principales acciones de las prostaglandinas son la broncoconstricción y aparición de edema (PGD<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub>). También actúan sobre la microvascularización, aumentando la secreción de las glándulas submucosas, y son quimiotácticas para neutrófilos y eosinófilos.

-Vía de la lipoxigenasa: se sintetizan diferentes metabolitos dependiendo de las enzimas que intervengan (las tres vías más importantes son la 5, la 12 y la 15-lipoxigenasa, aunque sólo la primera y la última participan en el asma bronquial). Por la vía de la 5-lipoxigenasa se forman los LTB<sub>4</sub> (quimiotáctico de neutrófilos y eosinófilos y activador de neutrófilos), LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>. Los tres últimos son potentes broncoconstrictores y quimiotácticos de eosinófilos. La vía de la 15-lipoxigenasa genera el 15-HETE, al que se le han atribuido funciones reguladoras de la síntesis de otros productos proinflamatorios y broncoconstrictores como los leucotrienos.

De los fosfolípidos de membrana también deriva el PAF, inductor de la secreción de moco por las glándulas bronquiales submucosas, y potente broncoconstrictor y quimiotáctico de los eosinófilos.

Los mastocitos también producen citoquinas como diversas interleuquinas, el GM-CSF, el INF- $\gamma$ , la MPI-1 $\alpha$ , la MCP-3, el TGF- $\beta$  y el TNF- $\alpha$ <sup>102-106</sup>.

Los mediadores preformados y de nueva síntesis liberados por los mastocitos explican muchas de las respuestas fisiopatológicas típicas del asma, como la broncoconstricción, vasodilatación y secreción de moco, e inducen la formación de un foco inflamatorio que se

mantiene y amplifica por el reclutamiento de células con potencial inflamatorio (linfocitos T, neutrófilos y eosinófilos).

## 6.7. EOSINÓFILOS

La eosinofilia es un hecho característico de las enfermedades alérgicas. El aumento de los eosinófilos en el esputo o en la mucosa de las vías aéreas de los pacientes asmáticos es un hecho demostrado tanto del asma atópico como no atópico<sup>107</sup>.

Tras la exposición al alérgeno, los tejidos residentes en la vía aérea producen mediadores que promueven la atracción de los eosinófilos dentro de la misma. El GM-CSF, la IL-3 y la IL-5 estimulan el crecimiento de colonias de eosinófilos, su maduración y liberación de la médula ósea<sup>108</sup>. El lavado broncoalveolar, la inducción del esputo y la biopsia de la mucosa, realizadas antes y a pocas horas de la exposición al alérgeno, muestran una prominente acumulación y activación de los eosinófilos en las vías aéreas<sup>108</sup>.

Existe una fuerte correlación entre la eosinofilia del esputo, la activación del eosinófilo y la severidad del asma medida como hiperreactividad de la vía aérea<sup>110</sup>. Tras la provocación con alérgeno existe una transitoria eosinopenia a las 6 horas, seguida por una progresiva eosinofilia hasta las 24 horas posprovocación<sup>111</sup>. La eosinopenia se interpreta como consecuencia del selectivo reclutamiento de estas células dentro de las vías aéreas, que se correlaciona con la magnitud de la reacción tardía en el asma.

Los eosinófilos utilizan mecanismos de adhesión para unirse a las células endoteliales de las vénulas postcapilares a través de moléculas complementarias, como la VCAM-1 en las células endoteliales y su ligando VLA-4 en el eosinófilo<sup>112-114</sup>. Posteriormente emigran dentro del tejido a través de gradientes de factores quimiotácticos, tales como RANTES e IL-8<sup>115</sup>.

Su presencia en la luz de la vía aérea y su habilidad para expresar receptores de baja afinidad para IgE provee un mecanismo de interacción directa con los alérgenos inhala-



dos<sup>116</sup>. Debido a la liberación de sus mediadores preformados y de nueva síntesis, los eosinófilos tienen una importante función proinflamatoria y son una de las células claves responsables de la inflamación de las vías aéreas en el asma<sup>117</sup>.

La activación del eosinófilo produce la liberación de sustancias vasoactivas, sustancias broncoconstrictoras y proteínas básicas. Cuatro proteínas ricas en arginina han sido observadas en los gránulos de los eosinófilos humanos: La proteína básica mayor, la proteína catiónica eosinófila (PCE), la peroxidasa del eosinófilo y la neurotoxina derivada del eosinófilo. La capacidad de estas proteínas para dañar el epitelio, produciendo su lisis y descamación, explica la correlación existente entre el grado de separación de las uniones epiteliales y el número de eosinófilos infiltrantes<sup>118</sup>. El daño epitelial es producido por efectos citotóxicos directos y pérdida no citotóxica de la adhesión entre las células columnares (suprabasales) y basales del epitelio, probablemente como consecuencia de un ataque dirigido contra los desmosomas<sup>119-121</sup>. La destrucción del epitelio produce la secreción de factores de crecimiento para las células epiteliales, fibras musculares lisas bronquiales y fibroblastos, originando como respuesta un tejido de regeneración y la remodelación de la mucosa. La afectación proteolítica de la membrana basal va seguida de su engrosamiento por el depósito de fibras de colágeno I, III y V<sup>49, 122-123</sup> y de fibronectina producidos por los fibroblastos<sup>124</sup>. La proliferación de la musculatura lisa bronquial y del tejido microvascular, agravado por el edema intersticial y el moco bronquial, conduce a una alteración estructural de la vía aérea, originando todo ello una pérdida de elasticidad bronquial<sup>125</sup> y, como consecuencia, un aumento de la obstrucción bronquial, su irreversibilidad y la cronicidad de la enfermedad. Todo ello es lo que se ha llamado remodelado de las vías aéreas.

Una vez activados, los eosinófilos humanos, al igual que los mastocitos, generan y liberan una serie de productos derivados lipídicos<sup>126</sup> incluyendo hidroxiacidos de las vías 5- y 15-lipooxigenasa, PAF<sup>117</sup>, LTB<sub>4</sub> y LTC<sub>4</sub>. De esta manera, la capacidad del eosinófilo para dañar los tejidos circundantes, por la liberación del contenido de sus gránulos citotóxicos, es suplementada por su habilidad para producir factores broncoconstrictores, quimiotácticos y vasoactivos, los cuales contribuyen al proceso asmático.

Los eosinófilos también poseen la capacidad de producir diversas interleucinas y citoquinas<sup>128-130</sup> que van a producir un aumento del depósito de colágeno y de la adhesión celular, migración, activación y supervivencia del eosinófilo.

## **7. RESPUESTA ASMÁTICA INMEDIATA Y TARDÍA**

La inhalación de un alérgeno por un asmático sensible a aquel suele producir una obstrucción bronquial que se inicia a los 10-15 minutos y que mejora al cabo de 30-60 minutos (reacción inmediata). En el 30-50% de los pacientes que han presentado una reacción inmediata, existe una segunda ola de broncoconstricción, la denominada reacción tardía, que se desarrolla horas después, y que se caracteriza por ser de desarrollo más lento y prolongado (reacción tardía). En una minoría sólo se produce reacción tardía sin reacción inmediata. Tras la provocación con alérgeno se puede provocar una reacción inmediata sólo, dual (inmediata y tardía) y más raramente sólo tardía<sup>131</sup>.

La fase inmediata<sup>132</sup> se inicia rápidamente tras la estimulación del antígeno. Se caracteriza por la presencia de una obstrucción de la vía aérea, el aumento de la permeabilidad vascular y la caída rápida del FEV<sub>1</sub>, que alcanza su máximo grado a los 10-15 minutos del inicio y revierte a valores basales en una hora, de forma espontánea o tras la administración de tratamiento.

En la patogenia de la fase inmediata intervienen primero las células captadoras del antígeno, y tras realizar su misión se liberarán los mediadores inflamatorios, que actuarán sobre las estructuras bronquiales produciendo la obstrucción. En el proceso intervienen los mastocitos sobre todo, pero también los basófilos, los macrófagos alveolares, los linfocitos y las plaquetas. Los mediadores liberados son la histamina, la heparina, el factor quimiotáctico de los neutrófilos y las enzimas (triptasa fundamentalmente), que producen la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad vascular. Como consecuencia, aparece el edema de la mucosa, la broncoconstricción del músculo liso, el aumento de la secreción mucosa y la activa-

ción del complemento por la vía alternativa (lo que producirá quimioatracción y activación de los neutrófilos y de los eosinófilos). Además, los cambios en la membrana plasmática, debidos a la activación celular por el estímulo antigénico, permiten que la fosfolipasa A libere ácido araquidónico, el cual puede ser metabolizado formando leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos.

La fase tardía<sup>133</sup> aparece en un 30-50% de los pacientes, después de la fase inmediata y tras un periodo de latencia de varias horas. Su instauración y resolución es más lenta, con una reducción del FEV<sub>1</sub> entre las 4 y 8 horas siguientes a la estimulación del antígeno, y se puede prolongar durante horas.

La fase tardía comienza a desarrollarse a las 4-8 horas de la fase inmediata. Se desarrolla un proceso broncoespástico y aparece un edema en la submucosa y una infiltración abundante de células inflamatorias (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, mastocitos y linfocitos T helper) reclutadas por los factores quimiotácticos liberados en la fase anterior, en los que el eosinófilo juega un papel destacado<sup>134</sup>. En el curso de las 6 horas siguientes a una exposición alérgica segmentaria de las vías aéreas asmáticas sensibilizadas, el endotelio experimenta una notable estimulación para selectina E y la ICAM-1, acompañada de un influjo de leucocitos LFA-1 que incluye tanto neutrófilos como eosinófilos<sup>135-136</sup>. También pueden intervenir las células del epitelio. Las células inflamatorias liberan mediadores preformados y otros derivados de la activación de la membrana celular.

La fase tardía es más severa, tarda en ocasiones varios días en resolverse totalmente y se acompaña de una hiperrespuesta bronquial a diferentes estímulos inespecíficos.

En la evolución natural del asma se puede hablar de una fase de cronificación: cuando el estímulo alérgico persiste o el paciente no se trata adecuadamente, el proceso se puede perpetuar durante varios días y aparecer hiperrespuesta bronquial y una obstrucción fluctuante de la vía aérea, pudiendo aparecer una disminución de la reversibilidad después de varias décadas de padecer la enfermedad<sup>137-138</sup>.

## 8. INTERLEUCINA 2<sup>58</sup>

En 1976, Morgan et al describieron un factor en el sobrenadante de cultivos de linfocitos activados que podría promover el crecimiento y la proliferación de las células T humanas<sup>139</sup>. Desde entonces, numerosos trabajos se han dirigido hacia la caracterización molecular y bioquímica de esta importante linfoquina, denominada interleucina 2 (IL-2), que ha demostrado ocupar un papel central en la generación de la respuesta inmune. La IL-2, originalmente llamada *factor de proliferación de la célula T* (TCGF, del inglés *T cell growth factor*) es un factor de crecimiento para los linfocitos T estimulados por el antígeno, siendo responsable de la expansión clonal del linfocito tras el reconocimiento antigénico. La IL-2 es la principal citoquina responsable de la progresión de los linfocitos T desde la fase G<sub>1</sub> a la fase S del ciclo celular.

La IL-2 es producida por las células T CD4, y en menor cantidad por las células T CD8. La activación de las células T por los antígenos, y las diferentes señales coestimuladoras entre el linfocito T y la CPA, estimula la transcripción del gen de la IL-2 y la síntesis y secreción de la misma. La IL-2 actúa sobre la misma célula que la produce, es decir, funciona como un factor de proliferación autocrino. También actúa en los linfocitos T cercanos, células CD4 y CD8, y por lo tanto es también un factor de proliferación paracrino. Durante la respuesta inmunitaria fisiológica, la IL-2 no circula en la sangre para actuar a distancia, por lo que no se la considera factor de proliferación endocrino. La IL-2 normalmente se transcribe, sintetiza y secreta por las células T sólo tras la activación por los antígenos. La síntesis de IL-2 suele ser transitoria, con un pico precoz de secreción que se produce aproximadamente 8 a 12 horas después de la activación.

La IL-2 secretada es una glicoproteína de 153 aminoácidos y un peso molecular de 14 a 17 kD, codificada por un solo gen situado en la región q26-28 del brazo largo del cromosoma 4 en los seres humanos<sup>140</sup>. El tamaño heterogéneo de la proteína madura se debe a la extensión variable de la glucosilación de un polipéptido de aproximadamente 130 ami-

noácidos. La IL-2 nativa se pliega en una proteína globular que contiene dos grupos de hélice- $\alpha$  paralelas en parejas (en total 4 hélices alfa), estando orientada cada hoja en una leve angulación respecto de la otra. Esta estructura plegada en hélice- $\alpha$  es común a todas las citoquinas que interactúan con receptores que tienen la secuencia WSXWS, incluidas la IL-3, la IL-4, la IL-5, la IL-6, el GM-CSF y el G-CSF.

La IL-2 es el principal factor de proliferación autocrino de los linfocitos T, siendo la cantidad de IL-2 sintetizada por las células TCD4 un determinante importante de la magnitud de la respuesta inmunitaria que depende de las células T. La IL-2 estimula también la síntesis de otras citoquinas derivadas de la célula T, como el INF- $\gamma$ , la IL-4 y la linfotoxina. Además produce la inducción del promotor del gen que codifica para la subunidad  $\alpha$  del IL-2R, así como la inducción del promotor del gen que codifica para su propia síntesis, la de la IL-2, creando un sistema de retroalimentación positiva. La incapacidad para secretar cantidades adecuadas de IL-2 ha sido descrita como causa de anergia de las células T específicas de antígeno.

La IL-2 potencia la muerte apoptótica de las células T activadas por el antígeno. La activación de las células T en presencia de IL-2 hace a estas células sensitivas a la apoptosis a través de la vía fas. Por otra parte, la IL-2 también aumenta la supervivencia de la célula a través de la inducción de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2. Es controvertido que la misma citoquina pueda estimular la supervivencia y proliferación celular T por una parte, y promover la muerte celular por otra. Parece ser que si una respuesta inmune es persistente, y las células T están expuestas a elevadas cantidades de IL-2, la acción proapoptótica llega a ser dominante, contribuyendo de esta forma a la terminación de la respuesta.

La IL-2 estimula la proliferación de las células NK y aumenta su función citolítica, produciendo las también conocidas como células agresoras activadas por linfocinas (LAK, del inglés, *linphokine-activated killer*). La IL-2 actúa sinérgicamente con otras citoquinas, especialmente con la IL-12, para inducir la secreción de INF- $\gamma$  por las células NK.

La IL-2 actúa sobre las células B humanas como factor de proliferación y como estímulo para la síntesis de anticuerpos, aunque no parece producir el "*switching*" o cambio de isotipo (Figura 3).

Las acciones de la IL-2 sobre otras poblaciones celulares están peor establecidas. Los receptores proteicos de la IL-2 se han detectado en los fagocitos mononucleares, no obstante, no se ha descrito ninguna función de la IL-2 en este tipo de célula. Los ratones en los que se ha anulado el gen de la IL-2 mediante la tecnología del "*knock out*" parecen tener un sistema inmunitario relativamente normal. Estas observaciones sugieren que muchas acciones de la IL-2 pueden ser redundantes o, más probable, que en el timo pueden surgir y seleccionarse células T independientes de la IL-2.

## **9. RECEPTOR DE INTERLEUCINA 2<sup>141</sup>**

La acción de la IL-2 sobre las células T está mediada por la unión a su receptor. Este sistema es quizás el mejor conocido de todos los receptores de citoquinas. El receptor de la IL-2 (IL-2R) pertenece a la familia de receptores de hematopoyetinas, formado por tres proteínas asociadas no covalentemente llamadas alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ). Las cadenas alfa y beta se encargan de unir a la IL-2, y la cadena beta y gamma, de transducir la señal<sup>142-143</sup>. El IL-2R es expresado en la superficie de diferentes tipos de células como los linfocitos T u B, las células NK y las células monocíticas (Figura 4).

Se ha demostrado que la expresión del IL-2R en los linfocitos T ocurre tras la estimulación inicial con el alérgeno (sobre las 24 horas tras el estímulo) y desaparece en pocos días tras la desaparición del estímulo<sup>144</sup>.

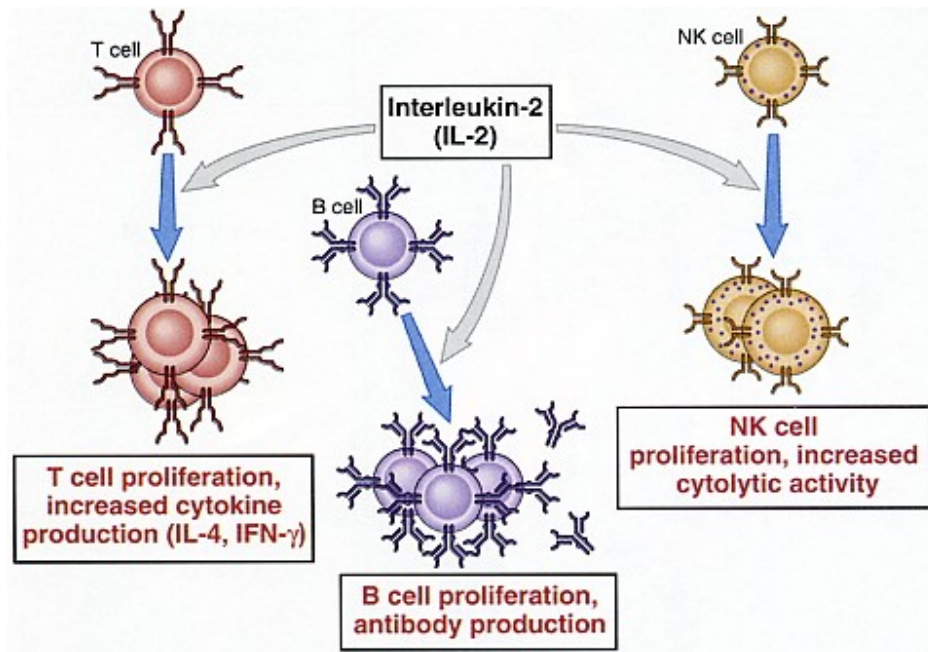


Figura 3. Acciones de la IL-2. Tomado de Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Effector mechanisms of immune responses. En: Abbas A, Lichtman A, Pober J, eds. Cellular and molecular immunology, 4ª ed. Philadelphia: Saunders, 2000;255-258.

La expresión del IL-2R es nula en el 98% de las células mononucleares en reposo y no responde al cultivo celular cuando se añade exógenamente IL-2. Sin embargo, cuando es estimulada con un mitógeno como la PHA, se activan las células T, las cuales expresan de manera asincrónica IL-2R, de manera que entre las 72 y 96 horas alcanzan la mayor concentración de receptores en la superficie del linfocito. A continuación el nivel de receptores decae, tal vez como consecuencia de una regulación a la baja por parte de la IL-2 secretada, la proliferación cesa y las células pasan a la fase de reposo del ciclo celular, siendo mínima la expresión del IL-2R a las dos semanas del estímulo<sup>145</sup>.

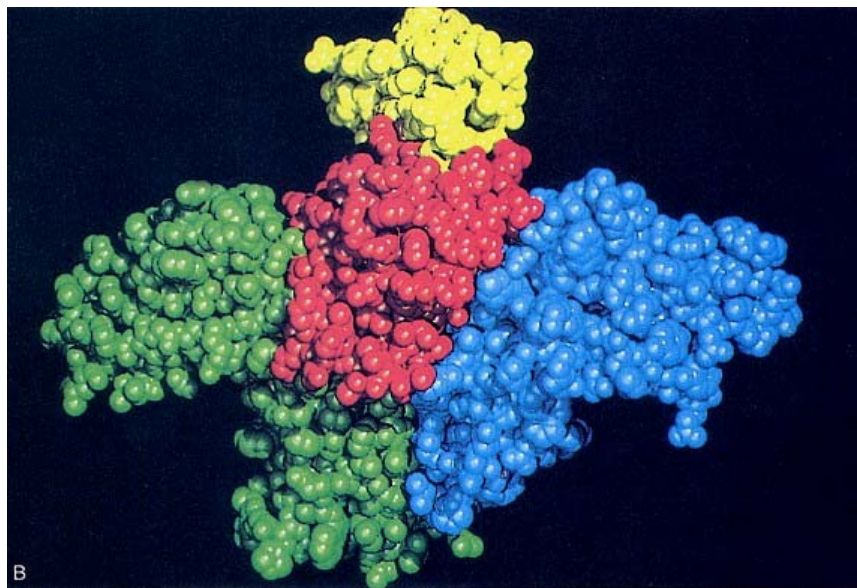
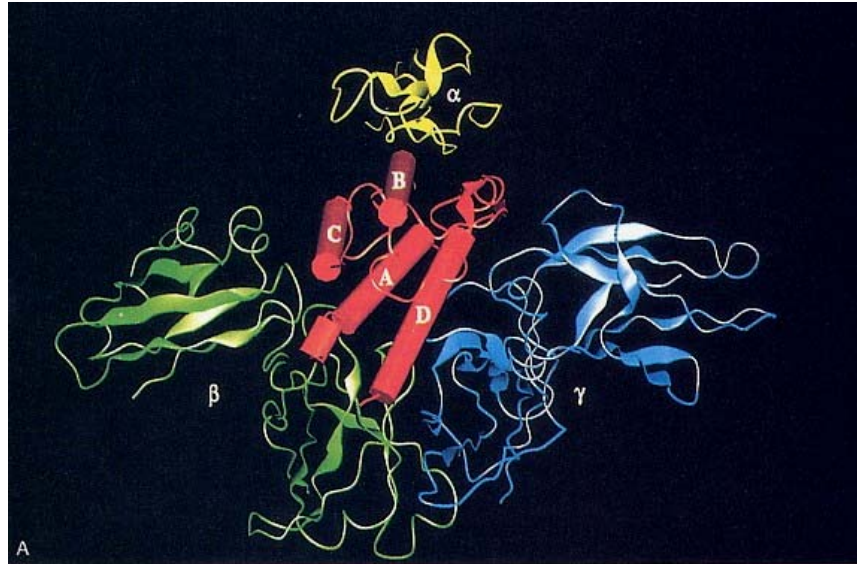


Figura 4. Modelo de unión de IL-2 a su receptor. La IL-2 se muestra en rojo, y las cadenas alfa, beta y gamma están mostradas en amarillo, verde y azul respectivamente. Las cuatro hélices alfa de la molécula de IL-2 son nombradas A, B, C y D. Tomado de Theze J, Alzari PM, Bertoglio J. Interleukin 2 and its receptors: recent advenles and new immunological functions. *Immunology Today* 1996;17:481-486.



Como hemos dicho, hay dos proteínas de superficie celular diferentes que se unen a la IL-2. La primera en identificarse, llamada IL-2R $\alpha$ , es un polipéptido de 55 kD (p55) que aparece tras la activación de la célula T y al que se llamó en un principio antígeno Tac (por activación T) o CD25<sup>146</sup>. EL IL-2R $\alpha$  se une a la IL-2 con una  $K_d$  de aproximadamente  $10^{-8}$  M. La unión de la IL-2 a las células que expresan sólo el IL-2R $\alpha$  no produce ninguna respuesta biológica detectable.

La segunda proteína que se une a la IL-2, llamada IL-2R $\beta$ , tiene aproximadamente 70 a 75 kD (llamada previamente p70 o p75 o CD122) y es miembro de la familia de receptores caracterizada por la estructura WSXWS, que se caracterizan por poseer una proteína anclada a la membrana, con un dominio extracelular en el que hay al menos un motivo característico CCCC (cuatro cisteínas cercanas en posición equivalentes) y llamado motivo WSXWS (Trp-Ser-X-Trp-Ser), y tras su porción transmembrana se encuentra una larga cola citoplasmática con ciertas tirosinas susceptibles de fosforilación. La afinidad de la unión por este receptor es mayor que por el IL-2R $\alpha$ , con una  $K_d$  de aproximadamente unos  $10^{-9}$  M. El IL-2R $\beta$  se expresa a bajos niveles en las células T en reposo junto a un polipéptido de 64 kD llamado IL-2R $\gamma$ .

Posteriormente se identificó una tercera cadena, denominada IL-2R $\gamma$ <sup>147</sup>, que es también un miembro de la familia WSXWS, formando con la IL-2R $\beta$  el complejo denominado IL-2R $\beta\gamma$ . La cadena  $\gamma$  también es usada en la transmisión de señales por diferentes interleuquinas (IL-4, IL-7, IL-9, IL13 e IL-15) que la incorporan en su receptor<sup>148</sup>. La ausencia de la cadena  $\gamma$  es responsable de una forma de inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X, que pone de manifiesto la necesidad de esta cadena para la transmisión de la señal<sup>149</sup>.

La IL-2 provoca la proliferación de las células que expresan sólo IL-2R $\beta\gamma$ , produciendo la mitad de estimulación proliferativa máxima con la misma concentración de IL-2

que produce la mitad de unión máxima. Las células que expresan IL-2R $\alpha$  e IL-2R $\beta\gamma$  pueden unirse a la IL-2 con mayor fuerza, con una  $K_d$  de aproximadamente  $10^{-11}$  M (estas observaciones se han interpretado como que el IL-2R $\alpha$  forma un complejo con el IL-2R $\beta\gamma$ , aumentando la afinidad de este último por la IL-2, y permitiendo, por tanto, producir una señal de proliferación con concentraciones significativamente menores de IL-2)<sup>150-151</sup>. Se cree que la IL-2 se une primero al IL-2R $\alpha$ , ya que esto facilita la asociación con el IL-2R $\beta\gamma$ .

Las células T en reposo expresan IL-2R $\beta\gamma$  pero no IL-2R $\alpha$ , y pueden ser estimuladas sólo por niveles elevados de IL-2. Tras la activación de la célula T por el antígeno, se expresa con rapidez el IL-2R $\alpha$ , reduciendo así la concentración de IL-2 necesaria para la estimulación de la proliferación. De hecho, la propia IL-2 puede aumentar la síntesis de IL-2R $\alpha$ . Como la estimulación antigénica potencia la expresión del IL-2R completo, las células T que reconocen el antígeno son también las células que proliferan preferencialmente en respuesta a los niveles fisiológicos de IL-2 producidos durante la respuesta inmune adaptativa (Figura 5).

Las células NK, como las células T en reposo, expresan IL-2R $\beta\gamma$ , pudiendo ser estimuladas por niveles elevados de IL-2, sin embargo no expresan el IL-2R $\alpha$ , no reduciéndose la cantidad de IL-2 necesaria para estimular su proliferación.

Aunque se conoce bastante acerca de la interacción entre la IL-2 y su receptor, aún no se han identificado todas las señales intracelulares producidas por la unión de la citoquina. Se conoce que la unión de la IL-2 a su receptor provoca la activación de múltiples vías de transducción de señal, que incluyen la vía JAK/STAT, que es única para las citoquinas, y las vías ras y fosfatidilinositol-3 quinasa, que son activadas por muchos tipos de receptores. Tras la exposición a la IL-2, las células T muestran un rápido aumento en las concentraciones de ciclín D2 y ciclín E, proteínas que activan diferentes quinasas ciclín-dependientes. Las quinasas fosforilan y activan una variedad de proteínas celulares que estimulan la transición desde la fase G<sub>1</sub> a la fase S del ciclo celular. Un modelo general podría ser el siguiente:

-La citoquina provoca la dimerización de las dos subunidades del receptor (cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ ), lo que coloca cercanas a sus respectivas colas citoplásmicas.

-Una serie de proteín-quinazas de la familia de JAK (quinasas Jano) se unen a las colas agrupadas de las subunidades del receptor, con lo que se esas quinasas se activan.

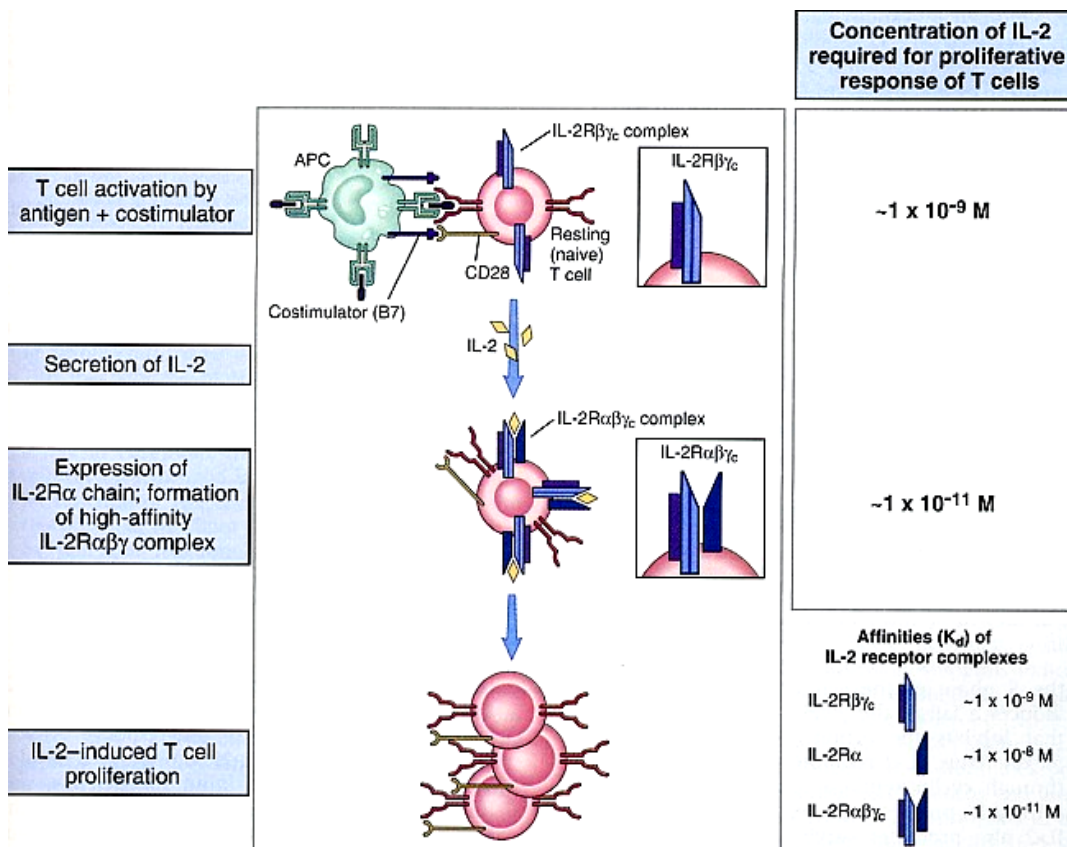


Figura 5. El receptor de alta afinidad de la IL-2 (IL-2R) se compone de un complejo de dos polipéptidos separados (IL-2R $\beta\gamma$  e IL-2R $\alpha$ ) que interaccionan para unirse a la IL-2 con alta afinidad. Las células T en reposo expresan sólo IL-2R $\beta\gamma$ , que se une a la IL-2 con baja afinidad. La activación de la célula T por el antígeno y la célula presentadora conduce a la síntesis y expresión de IL-2R $\alpha$ , aumentando la afinidad de los IL-2R $\beta\gamma$  y permitiendo la estimulación de la proliferación a concentraciones fisiológicas de IL-2. La IL-2 producida por la célula T activada aumenta aún más la expresión de IL-2R $\alpha$  y estimula la síntesis de IL-2, proporcionando un sistema de amplificación positivo. Tomado de Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Effector mechanisms of immune responses. En: Abbas A, Lichtman A, Pober J, eds. Cellular and molecular immunology, 4ª ed. Philadelphia: Saunders, 2000;255-258.

-Las JAK se autofosforilan.

-Las JAK fosforilan a su vez determinadas tirosinas de las colas del receptor, entonces, proteínas de otra familia, llamada STAT (iniciales inglesas de transductores de señal y activadores de transcripción) se unen a algunas de las tirosinas fosforiladas de las colas del receptor, quedando cerca de las JAK.

-Las JAK fosforilan a las STAT unidas a las colas del receptor.

-Al quedar fosforiladas, las STAT pierden su afinidad por las colas del receptor, y en cambio tienden a formar dímeros entre sí (las tirosinas fosforiladas que han quedado libres en las colas del receptor sirven para unir nuevos monómeros de STATs).

-Los dímeros de STAT fosforilados emigran al núcleo de la célula, donde actúan ahora como activadores de la transcripción de ciertos genes, al unirse a secuencias especiales en la parte 5' respecto de las respectivas porciones codificadoras.

La IL-2 induce una caída de los niveles de una proteína llamada p27 que inhibe la acción del complejo ciclín-quinasa.

## **10. RECEPTOR SOLUBLE DE INTERLEUCINA 2 (sIL-2R)<sup>58, 141</sup>**

### **10.1. CARACTERIZACIÓN DEL sIL-2R**

En 1985 Rubin informó por primera vez que, además de la expresión de novo del IL-2R en las células T activadas en sangre periférica, podía liberarse en gran cantidad una forma soluble de esta molécula (denominada sIL-2R), que puede ser detectada en el sobrenadante de cultivos linfocitarios T activados in vitro con OKT3 o PHA<sup>152</sup>. Desde esta observa-

ción inicial, se ha investigado ampliamente la procedencia del sIL-2R y sus características estructurales, funcionales y moleculares<sup>153-154</sup>.

La estimulación crónica de la célula T conduce al desprendimiento del IL-2R $\alpha$  de la superficie celular, llamado sIL-2R, al poder ser detectado en suero. El sIL-2R es una proteína glicosilada de 45 Kd que corresponde a los 192 aminoácidos N-terminales de la subunidad  $\alpha$ . Clínicamente, un nivel elevado de IL-2R $\alpha$  en el suero es un marcador de fuerte estimulación antigénica.

La utilización de anticuerpos monoclonales de ratón que reconocen el receptor proteico de la IL-2 de 55 kd ha contribuido significativamente a nuestro entendimiento de las características bioquímicas y moleculares de la cadena alfa del IL-2R. La disponibilidad de dos anticuerpos monoclonales anti IL-2R distintos no competitivos, anti Tac y 767/B6 facilitan la realización de un “*sandwich*” enzimoimmunoabsorbente (ELISA) para la detección de la forma soluble de la molécula Tac (sIL-2R)<sup>155</sup>.

Todavía no se ha explicado el modo en que la expresión del IL-2R de membrana estaría relacionada con la aparición del sIL-2R sérica. Dos hipótesis, no excluyentes, se han presentado para explicar la codificación y liberación del sIL-2R. La primera hipótesis establece que se produciría una proteólisis del dominio extracelular de la subunidad  $\alpha$  del IL-2R de membrana mediante una enzima de membrana. La segunda hipótesis plantea que se produciría una codificación inducida, mediante *splicing* alternativo, de la forma extracelular de la subunidad  $\alpha$ , seguida de su secreción directa.

La activación del linfocito T no sólo permite la expresión en la superficie celular de la IL-2R y la interacción de la IL-2 con su receptor, sino que también propicia la liberación de moléculas de sIL-2R<sup>152</sup>. Así, los niveles séricos de sIL-2R se correlacionan fuertemente con el número de linfocitos T CD25 activados, tanto en sangre periférica como en mucosa bronquial<sup>156</sup>. Varios estudios han confirmado la fuerte asociación de los niveles séricos de

sIL-2R con la activación de linfocitos T in vitro, y han indicado que la producción de sIL-2R es directamente proporcional a la expresión celular de IL-2R<sup>152</sup>.

## **10.2. ORIGEN DEL sIL-2R**

Los investigadores han descubierto la presencia de sIL-2R en diferentes cultivos celulares como el de linfocitos T activados por lectinas o antígenos<sup>152</sup>, monocitos (en los que el sIL-2R se localiza principalmente en el citoplasma)<sup>157</sup>, linfocitos B activados<sup>158</sup> (aunque las concentraciones de sIL-2R detectadas no han sido tan elevadas como las encontradas en cultivos de células T), células NK<sup>159</sup> y eosinófilos activados en presencia de IL-2, GM-CSF o IL-5<sup>160</sup>.

En la literatura científica hay una tendencia a correlacionar la expresión de sIL-2R con aquellas líneas celulares mononucleares activadas que expresan el IL-2R de membrana, es decir, linfocitos T y B, células NK y monocitos-macrófagos. La relación entre ambos receptores es evidente en su estructura, ya que la forma del sIL-2R es la del dominio extracelular de la subunidad  $\alpha$  del IL-2R.

La presencia de sIL-2R en cultivos de otras líneas celulares diferentes del linfocito T, como eosinófilos o linfocitos B, plantea cuestionar el origen del sIL-2R que se detecta en el suero. En este sentido, Motojima determinó las concentraciones séricas de la PCE y del sCD25 en el suero de 66 pacientes asmáticos, y demostró que no existía correlación entre ellas<sup>161</sup>. Debido al pequeño número de linfocitos B y monocitos que expresan IL-2R<sup>162</sup> se asume que la mayoría del sIL-2R en suero es elaborado por linfocitos T activados, y por tanto, su nivel puede ser usado satisfactoriamente como un marcador de la activación del linfocito T in vivo.

### 10.3. FUNCIÓN DEL sIL-2R

Tampoco existe un consenso general acerca de la acción biológica que ejerce esta proteína en el sistema inmune. Se conoce que el sIL-2R compete con el IL-2R en la superficie del linfocito por la IL-2<sup>153, 163</sup>, lo que podría implicarlo en la regulación de la respuesta inmune, al disminuir la expresión de IL-2R inducida por la IL-2. De esta forma se podría regular la proliferación linfocitaria desencadenada por el estímulo antigénico. En base a esta función, diversos autores han intentado explicar el fracaso del tratamiento con IL-2 como droga inmunomoduladora, en algunos tumores. Podría ser que concentraciones elevadas de sCD25 en sangre periférica de estos pacientes, al captar la IL-2 administrada exógenamente, disminuyeran la biodisponibilidad de la IL-2, dificultando de este modo su actividad terapéutica<sup>164</sup>.

Esta teoría se encuentra relacionada con la *down-regulation* de la respuesta dependiente de la IL-2, ya que se disminuye la densidad de IL-2R de membrana disponible para la IL-2 y se ejerce una competición con el IL-2R de membrana por la unión con la IL-2, sin embargo, la mucha mayor afinidad del IL-2R $\alpha\beta\gamma$  por la IL-2, comparada con la del IL-2R $\alpha$  sólo, sugiere que no es probable que el IL-2R $\alpha$  contribuya de forma significativa a la inmunosupresión.

### 10.4. SIGNIFICADO CLÍNICO DEL sIL-2R

La respuesta de los linfocitos T activados a la IL-2 está relacionada con la expresión de IL-2R y, por tanto, con la secreción de sIL-2R, de forma que la concentración sérica de sCD25 puede indicar la magnitud de la activación inmune in vivo.

Hay que tener presente que el sIL-2R sérico no es sólo un marcador sensible de la activación de las células mononucleares de sangre periférica, sino que puede también reflejar activación inmune de otros tejidos o compartimentos fluidos, ya que el sIL-2R generado en esos espacios puede pasar al *pool* circulatorio.

Otra cuestión importante es qué circunstancias o alteraciones pueden afectar a los niveles séricos del sIL-2R. Así, el daño de la función renal eleva los niveles séricos de sIL-2R, ya que es probable que esta molécula sea excretada por la orina. Por otra parte, el tabaquismo<sup>165-166</sup> y el ejercicio físico<sup>167</sup> elevan sus niveles.

Se han informado niveles bajos en el suero en una población de adultos sanos, lo que traduce una línea basal de activación inmune bajo estímulos fisiológicos normales<sup>168</sup>.

Después de las primeras observaciones que destacaban la producción de sIL-2R por células mononucleares normales activadas en sangre periférica y en alguna línea de células tumorales *in vitro*, se han cuantificado los niveles de sIL-2R en varias enfermedades *in vivo*, como la leucemia de células T del adulto. Algunas líneas tumorales de células T que expresan constitutivamente el IL-2R pueden liberar una gran cantidad de la forma soluble de esta molécula. Se sabe, por los trabajos realizados en este sentido, que en linfocitos normales la generación de sIL-2R es “activación dependiente”, excepto en neoplasias específicas en las que el fenotipo maligno está caracterizado por la expresión constitutiva de la molécula Tac y la liberación del sIL-2R. Desde estos estudios iniciales, las situaciones en las que se han detectado niveles elevados de sIL-2R sérico han aumentado considerablemente (Tabla 1).



**Tabla 1. Aumento de sIL-2R en enfermedades humanas**

**ENFERMEDADES MALIGNAS**

Leucemia de células T del adulto<sup>169</sup>.  
Leucemia de células peludas<sup>170</sup>.  
Leucemia linfocítica<sup>171</sup>.  
Leucemia mieloide aguda<sup>172</sup>.  
Linfoma de Hodgkin<sup>173</sup>.  
Linfoma no Hodgkin<sup>174</sup>.  
Cáncer de hígado, pulmón, mama y ovarios<sup>165, 175-176</sup>.  
Melanoma<sup>177</sup>.  
Linfoma cutáneo de células T<sup>178</sup>.  
Micosis fungoide<sup>179</sup>.

**ENFERMEDADES INFLAMATORIAS AUTO-INMUNES**

Artritis reumatoide juvenil<sup>180</sup>.  
Artritis reumatoide<sup>181</sup>.  
Lupus eritematoso sistémico<sup>182</sup>.  
Esclerosis sistémica<sup>183</sup>.  
Polimiositis<sup>184</sup>.  
Enfermedad de Kawasaki<sup>185</sup>.  
Esclerosis múltiple<sup>186</sup>.  
Diabetes mellitus tipo I<sup>187</sup>.  
Enfermedad inflamatoria intestinal<sup>188</sup>.  
Tiroiditis subaguda<sup>189</sup>.  
Síndrome de Guillain-Barre<sup>190</sup>.  
Enfermedad celiaca<sup>191</sup>.  
Psoriasis<sup>192</sup>.

**ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

Hepatitis<sup>193</sup>.  
SIDA<sup>194-195</sup>.

Mononucleosis infecciosa<sup>196</sup>.  
Sarampión<sup>197</sup>.  
Lepra<sup>198</sup>.  
Tuberculosis<sup>199</sup>.  
Paludismo<sup>200</sup>.

**TRANSPLANTE Y RECHAZO**

Riñón<sup>201</sup>.  
Pulmón<sup>202</sup>.  
Hígado<sup>203</sup>.

**ENFERMEDADES ALÉRGICAS**

Asma  
Rinitis alérgica<sup>204</sup>.  
Conjuntivitis alérgica<sup>205</sup>.  
Alveolitis alérgica extrínseca<sup>206</sup>.  
Aspergilosis broncopulmonar alérgica<sup>207</sup>.  
Dermatitis atópica<sup>208-209</sup>.  
Eccema atópico<sup>210</sup>.

**MISCELANEA**

Injuria térmica<sup>211</sup>.  
Insuficiencia renal crónica<sup>212</sup>.  
Sarcoidosis<sup>213</sup>.  
Esquizofrenia<sup>214</sup>.  
Depresión<sup>215</sup>.  
Cirrosis hepática<sup>216</sup>.  
Ictericia obstructiva<sup>216</sup>.  
Cardiomiopatía dilatada<sup>217</sup>.  
Tabaquismo<sup>165, 166</sup>.  
Ejercicio físico<sup>167</sup>.



### **III. JUSTIFICACIÓN**



La prevalencia de asma a nivel mundial justifica la continua investigación en el conocimiento de esta entidad. En las últimas décadas se ha avanzado de forma importante en el desarrollo de la inmunoterapia como único tratamiento etiológico del asma bronquial alérgico así como en el conocimiento de los mecanismos inmunológicos implicados tanto en la patogenia del asma como en los efectos ocasionados por la inmunoterapia, sin bien, hoy día, todos estos mecanismos no están completamente comprendidos. Por tanto, el estudio en este campo está abierto a nuevas aportaciones. De especial importancia es, en este sentido, el estudio del sIL-2R en el asma bronquial extrínseco.

Las diversas células que actúan en la reacción alérgica y sus mediadores son factores claves en la patogenia del asma bronquial. El importante papel del linfocito T en el asma bronquial como reconocedor del antígeno y organizador del resto de las células implicadas en la patogenia del asma ha podido ser demostrado en numerosos trabajos.

Hoy sabemos que el linfocito T, tras reconocer al antígeno o alérgeno para el cual es específico, se activa, liberando IL-2 y expresando IL-2R en su superficie celular, sobre el que actuará de forma autocrina y paracrina la IL-2 liberada, estimulando la proliferación celular y la adquisición del perfil de secreción de citoquinas T helper 2, propio de las enfermedades alérgicas. También sabemos, que en este proceso de activación linfocitaria, el linfocito T secreta una fracción del IL-2R, constituyendo el llamado sIL-2R, el cual puede ser medido en diversos fluidos como suero, fluido de lavado broncoalveolar, sobrenadante de cultivos celulares, etc.

Aunque existen trabajos publicados sobre este factor soluble, y la mayoría de estos parecen confirmar que se trata de un índice de activación celular T en el asma, su utilidad clínica en el diagnóstico, seguimiento o pronóstico de los pacientes asmáticos es controvertida.

Numerosos estudios han interpretado la elevación de los niveles de sIL-2R como marcador de la existencia de asma o de gravedad en el asma, debido a que los niveles de sIL-2R en el asma agudo o crónico mal controlado eran superiores a los hallados en el asma estable, y estos a su vez mayores que los encontrados en controles sanos. Sin embargo esto no ocurre siempre así, ya que en otros trabajos no se encuentra relación entre los niveles de sIL-2R y la severidad del asma, como demuestran publicaciones en las que se describen solapamientos entre los niveles de sIL-2R de pacientes asmáticos agudos y pacientes asmáticos estables, ausencia de diferencias entre los niveles de pacientes asmáticos, cualquiera que sea su grado de asma (leve, moderado o severo), y ausencia de diferencias entre los niveles de asmáticos asintomáticos y controles sanos. Esto ha llevado a cuestionar la utilidad de este factor en la práctica clínica.

Con nuestro trabajo pretendemos determinar la utilidad del sIL-2R como parámetro de exposición y tolerancia alérgica en pacientes asmáticos extrínsecos. Partimos de dos premisas. La primera es que este factor soluble no habría que interpretarlo como sinónimo de la existencia de asma, sino como parámetro de exposición, y que por tanto también pudiera utilizarse como parámetro de tolerabilidad alérgica en individuos sometidos a hiposensibilización mediante inmunoterapia. La segunda premisa es que nuestro trabajo plantea la determinación de los niveles de sIL-2R *in vitro*, en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA. ¿Por qué tras estimulación *in vitro* mejor que en suero? Hasta ahora, salvo el estudio de Hsieh<sup>218</sup>, ningún estudio se ha realizado *in vitro*, realizándose la mayoría de determinaciones en suero. Creemos que las pequeñas cantidades de sIL-2R en suero pueden modificarse menos debido al “factor diluyente” de toda la masa sanguínea sobre una producción auto o paracrina. Sin embargo, parte de los linfocitos en sangre periférica poseen la capacidad de estar estimulados y poder remedar los efectos ocasionados en el órgano de choque. Al ser estimulados con PHA, se amplificaría la producción de sIL-2R, siendo más evidentes las modificaciones de sus niveles. Estas premisas podrían justificar las contradicciones citadas encontradas entre los distintos estudios publicados.

Hasta la fecha, no existe ningún factor que pueda ser utilizado en el seguimiento de los pacientes tratados con inmunoterapia que nos informe de la utilidad de la misma en cada caso individualmente. Nuestro grupo propone que el sIL-2R puede ser un marcador útil de tolerancia alérgica en los pacientes tratados con inmunoterapia que podría ser utilizado en el seguimiento de los mismos.

En este sentido, planteamos un estudio en pacientes asmáticos extrínsecos sensibles a polen de gramíneas, en el que este parámetro se mediría en dos momentos distintos: antes de la estación polínica, cuando el paciente no está expuesto al alérgeno, y durante la estación polínica, cuando está expuesto al alérgeno de una forma natural. El estudio de los niveles de sIL-2R, en estos dos momentos, en personas sanas (grupo control) y pacientes asmáticos polínicos, podría poner de manifiesto diferencias en la producción de sIL-2R. Si estudiamos de igual modo a pacientes asmáticos polínicos hiposensibilizados con distintas pautas de inmunoterapia (preestacional y coestacional), podríamos poner de manifiesto las diferencias existentes entre el grupo tratado con inmunoterapia y los anteriores, que no reciben inmunoterapia, y entre los distintos grupos hiposensibilizados entre sí.

De este modo se establecería si el sIL-2R medido en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares es un parámetro de exposición y tolerancia alérgica en pacientes asmáticos extrínsecos, así como si existen diferencias entre los dos tipos de inmunoterapia utilizadas en lo que respecta a la producción de sIL-2R.

En un segundo tiempo determinaríamos qué cambios produce la exposición artificial en los niveles de sIL-2R de pacientes asmáticos extrínsecos polínicos, y si estos se correlacionan con los encontrados en la exposición natural. Para ello seleccionaríamos a un grupo de pacientes asmáticos extrínsecos sensibles al polen de gramíneas que serían expuestos a un test de provocación bronquial específica e inespecífica, con objeto de valorar el comportamiento de los niveles de sIL-2R ante una exposición artificial, así como la relación del tipo de reacción bronquial y de la sintomatología de los pacientes con los niveles de sIL-2R.

¿Por qué planteamos un trabajo en los términos descritos? Aunque existen trabajos publicados sobre el sIL-2R en el asma bronquial, ninguna se refiere en los términos descritos. La mayoría de las determinaciones de sIL-2R se han realizado en suero. Existen muy pocos trabajos que determinen el sIL-2R en pacientes sometidos a inmunoterapia<sup>218, 219-221</sup> y, que nosotros sepamos, existe sólo un trabajo que haya investigado la producción de sIL-2R en cultivo linfocitario de pacientes sometidos a inmunoterapia<sup>218</sup>. No hemos encontrado ningún estudio que se refiera en este sentido a los pacientes asmáticos polínicos, pues el referido trabajo de Hsieh se refiere a pacientes sensibles a ácaros del polvo doméstico. Son muy escasos los trabajos que comparen las pautas de inmunoterapia en pacientes polínicos y ninguno lo hace en los términos referidos. Por otra parte, son muy escasos, y de resultados contradictorios entre sí, los trabajos publicados que se refieran a las modificaciones ocasionadas por la provocación bronquial en los niveles de sIL-2R<sup>222-224</sup>.

En resumen, los estudios existentes sobre el comportamiento de los niveles de sIL-2R en pacientes sometidos a inmunoterapia y a provocación bronquial son escasos. Por otra parte, que sepamos, no existe ningún estudio que compare los niveles de sIL-2R en pacientes polínicos con inmunoterapia preestacional de aquellos con inmunoterapia coestacional. Creemos por tanto, que debe profundizarse en este campo como plantea nuestro trabajo, con objeto de valorar si la determinación de sIL-2R en estos pacientes es útil como medida de exposición y tolerabilidad alérgica. Que sepamos, ningún trabajo ha abordado el estudio que planteamos en estos términos. Con la cuantificación del sIL-2R en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares, pretendemos profundizar en la fisiopatología del asma bronquial extrínseco y validar al sIL-2R en cultivos celulares como parámetro de exposición y tolerabilidad alérgica en pacientes asmáticos extrínsecos. En el diseño de nuestro trabajo nos planteamos la posible utilidad de este receptor soluble como marcador válido de la existencia de exposición alérgica y de efectividad de la inmunoterapia en el asma.



## **IV. OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

- a. Validación de la determinación del receptor soluble de interleucina 2, en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, como parámetro de exposición alérgica específica, tanto natural como experimental, en pacientes asmáticos alérgicos a pólenes de gramíneas.
- b. Validación de la determinación del receptor soluble de interleucina 2, en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, como parámetro de tolerancia al alérgeno en pacientes asmáticos alérgicos a pólenes de gramíneas sometidos a inmunoterapia alérgica específica.
- c. Comparación de las pautas de inmunoterapia preestacional y coestacional en la producción del receptor soluble de interleucina 2, medido en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, en pacientes asmáticos alérgicos a pólenes de gramíneas sometidos a inmunoterapia alérgica específica.
- d. Determinar si la producción del receptor soluble de interleucina 2, en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, es un parámetro correlacionable con la sintomatología en los pacientes asmáticos alérgicos a pólenes de gramíneas.
- e. Determinar si la producción del receptor soluble de interleucina 2, en el sobrenadante de cultivos de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, es un parámetro de hiperreactividad bronquial en pacientes asmáticos alérgicos a pólenes de gramíneas.

- f. Determinar si existen diferencias en la producción de receptores solubles de interleucina 2, en el sobrenadante de cultivos de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, entre los pacientes asmáticos alérgicos a pólenes de gramíneas que presentan reacción inmediata sólo y aquellos que presentan reacción dual.

## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1. PACIENTES Y CONTROLES**

### **1.1. PROCEDENCIA DE LOS PACIENTES Y CENTRO DONDE SE REALIZÓ EL ESTUDIO**

Pacientes estudiados en el Servicio Regional de Inmunología y alergia (Hospital Universitario Virgen Macarena).

### **1.2. SELECCIÓN DE PACIENTES Y CONTROLES**

Se seleccionaron de forma aleatoria 103 pacientes con criterios de asma bronquial extrínseco sensibles a pólenes de gramíneas (grupo asmáticos, N: 103), los cuales se subdividieron en los siguientes subgrupos:

- Grupo 1: Pacientes con criterios de asma bronquial extrínseco sensibles a pólenes de gramíneas no sometidos a inmunoterapia (asmáticos no hiposensibilizados, N:63). Estos pacientes se asignaron de forma aleatoria a alguno de los subgrupos de estudio (exposición natural, provocación bronquial específica, inespecífica con metacolina, antígeno inespecífica y priming).

- Grupo 2: Pacientes asmáticos extrínsecos a pólenes de gramíneas sometidos a inmunoterapia alérgeno específica parenteral, según pauta convencional: (asmáticos hiposensibilizados, N: 40), de los que se separan dos grupos:

- Grupo 2A) Pacientes asmáticos extrínsecos a pólenes de gramíneas sometidos a inmunoterapia alérgeno específica preestacional durante al menos 3 años (N:20).

- Grupo 2B) Pacientes asmáticos extrínsecos a pólenes de gramíneas sometidos a inmunoterapia alérgeno específica coestacional (perenne) durante al menos 3 años (N:20).

Como grupo control se seleccionaron de forma aleatoria a 20 individuos sanos no atópicos (grupo 3, grupo control, N: 20).

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.

Consideramos sujetos asmáticos extrínsecos a pólenes de gramíneas a aquellos que presentaban una clínica sugerente, tenían un test cutáneo positivo a gramíneas dentro de la batería de alérgenos testados, con IgE total elevada e IgE específica positiva a dicho alérgenos. Los episodios sintomáticos debían presentarse de forma exclusivamente estacional.

Se incluyeron en el estudio, con idéntico protocolo, un grupo control compuesto por 20 voluntarios sanos (no asmáticos ni atópicos), que no presentaban patología inmunológica ni antecedentes personales o familiares de enfermedades alérgicas, con edades comprendidas entre los 18 y 50 años (edad media 26.75), siendo 11 hombres y 9 mujeres. Este grupo se caracterizaba por ser sujetos asintomático, sin clínica compatible, con test cutáneo negativo, IgE total baja, por debajo de 100 KU/l (CAP system) e IgE específica negativa.



### **1.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN DE LOS PACIENTES**

#### **1.3.1. Criterios de inclusión**

- Historia clínica de asma bronquial estacional alérgica por hipersensibilidad a pólenes de gramíneas.
- Pacientes que llevasen al menos dos estaciones polínicas presentando síntomas.
- Edad comprendida entre 18 y 60 años.
- Consentimiento por el paciente.
- Pruebas cutáneas positivas, mediante prick-test con pólenes de gramíneas (100 B.U./ml).
- Altos niveles de IgE específicas a polen de gramíneas.
- Capaces de realizar maniobras espirométricas técnicamente correctas<sup>225</sup> y repetibles (variaciones del FEV<sub>1</sub> entre las 3 mejores maniobras  $\leq 5\%$ ).
- FEV<sub>1</sub> > 80% del teórico.
- Criterios referidos en el apartado de la provocación bronquial.
- Haber recibido inmunoterapia alérgeno específica durante al menos 3 años (sólo para el grupo 2).

#### **1.3.2. Criterios de exclusión:**

- Inmunoterapia previa (sólo para el grupo 1)
- Asma intrínseco o extrínseco con sensibilización a otros alérgenos diferentes a gramíneas.
- Corticodependencia o asma de evolución grave.
- Patología pulmonar previa no alérgica.
- Mujeres en estado de gestación o periodo de lactancia.
- Fumadores y exfumadores.
- Enfermedades inmunológicas o padecimiento de otra enfermedad concomitante en la que pudiera estar alterado el sistema inmunitario.

- Edad diferente al intervalo señalado.
- Infección respiratoria 4 semanas previas a las determinaciones.
- No aceptación voluntaria de someterse a un estudio de provocación bronquial inespecífica o específica.

## **2. DISEÑO GLOBAL DEL ESTUDIO ( tabla 2)**

El estudio fue realizado en tres fases:

En una primera fase, que llamaremos T0 (Noviembre-Diciembre) se procedió a la selección de los pacientes que cumplían los criterios de inclusión, a la recogida de una serie de parámetros que a continuación detallamos y a la asignación aleatoria a los distintos subgrupos de estudio.

De los 123 participantes se recogieron los siguientes parámetros:

### 1. Datos de filiación:

- Nombre.
- Edad.
- Sexo.
- Dirección.
- Ocupación laboral.

### 2. Historia clínica detallada.

- Antecedentes familiares.
- Antecedentes personales.
- Antecedentes clínicos de interés alérgico.
- Hábito tabáquico.

-Medicación realizada.

-Tratamiento hiposensibilizante.

-Clínica.

-Intensidad de la clínica, cuantificada por el mismo médico, de 1 a 3, según la siguiente valoración:

1 (leve): los síntomas están presentes, pero apenas son molestos.

2 (moderada): los síntomas son molestos, pero no le impiden realizar sus actividades diarias.

3 (intensa): los síntomas son molestos y además le impiden realizar la mayoría de sus actividades diarias.

- Años de evolución de la enfermedad.

3. Exploración física general por aparatos.

4. Analítica general básica:

- Hemograma con fórmula y recuento.

- Velocidad de Sedimentación Globular.

- Bioquímica general.

- Orina básica.

5. Estudio radiológico convencional de tórax posteroanterior y lateral.

6. Test cutáneo mediante técnica "prick-test".

7. Determinación sérica de IgE total mediante técnica CAP System® (fabricado por Pharmacia, Suecia).

8. Determinación de IgE específica a pólenes de gramíneas mediante técnica CAP System® (Pharmacia, Suecia). En nuestro caso se emplearon los siguientes alérgenos: *Lolium perenne*, *Phleum pratense* y *Cynodon dactylon*.

La segunda fase del estudio se realizó en dos tiempos distintos, que llamaremos Tiempo 1 (T1) y Tiempo 2 (T2). El tiempo 1 corresponde a antes de la estación polínica de gramíneas en nuestro medio, en la cual el paciente no está sometido a niveles de pólenes reactivos atmosféricos, y que se realizó entre los meses de Enero y Febrero. El tiempo 2 (T2), corresponde a la estación polínica, cuando los niveles de pólenes a gramíneas se encuentran elevados en nuestro medio, y se realizó durante la primavera.

En la segunda fase del estudio se realizaron las siguientes pruebas y determinaciones:

1. Determinación de sIL-2R en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, mediante ELISA (Cellfree, T cell Diagnostic), antes de la estación polínica y durante la estación polínica (T1 y T2 respectivamente), en los pacientes de los distintos grupos:

- Grupo 1: Asmáticos sin inmunoterapia (N: 20).
- Grupo 2 A) con Inmunoterapia preestacional (N: 20).
- Grupo 2 B) con Inmunoterapia coestacional (N: 20).
- Grupo 3: controles sanos no atópicos (N: 20).

2. Determinación de sIL-2R en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, mediante ELISA (Cellfree, T cell Diagnostic), antes y tras la realización de un test de provocación bronquial antígeno específica en 20 pacientes del grupo 1, seleccionados aleatoriamente, con determinación de la FEV<sub>1</sub> inicial, de la PD<sub>20</sub>, y del tipo de reacción (inmediata/dual). Este test se realizó en T1 para evitar la interferencia

con el estímulo atmosférico. Los pacientes asignados a este subgrupo realizaron un score de síntomas y de uso de medicación de rescate durante la estación polínica (T2).

3. Determinación de sIL-2R en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, mediante ELISA (Cellfree, T cell Diagnostic), antes y tras la realización de un “priming” (provocación bronquial antígeno específica con dosis que no produzca broncoconstricción) en 7 pacientes del grupo 1, seleccionados aleatoriamente. Este test se realizó en T1 para evitar la interferencia con el estímulo atmosférico.

4. Determinación de sIL-2R en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, mediante ELISA (Cellfree, T cell Diagnostic), antes y tras la realización de un test de provocación bronquial inespecífica con metacolina en 8 pacientes del grupo 1, seleccionados aleatoriamente, con determinación de la PC<sub>20</sub>. Este test se realizó en T1 para evitar la interferencia con el estímulo atmosférico.

5. Determinación de sIL-2R en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, mediante ELISA (Cellfree, T cell Diagnostic), antes y tras la realización de una provocación bronquial antígeno inespecífica en 8 pacientes del grupo 1, seleccionados aleatoriamente, con un antígeno al cual no se encontraban sensibilizados (*D. pteronyssinus*). Este test se realizó en T1 para evitar la interferencia con el estímulo atmosférico.

En la tercera fase del estudio se realizó el análisis estadístico de los resultados.

Para la realización de las determinaciones, ningún paciente había recibido corticoides sistémicos en los últimos dos meses ni tópicos en los últimos quince días; los antihistamínicos, broncodilatadores, cromoglicato disódico y nedocromil sódico se suprimieron, al menos, 72 horas antes de la extracción de sangre. Se admitieron los beta miméticos inhalados

hasta seis horas antes o bien el tratamiento con inmunoterapia en aquellos que lo realizaban. Durante las dos semanas previas todos los pacientes y controles habían estado libre de infecciones (para los pacientes que realizaron provocación bronquial se siguió la pauta especificada en dicho apartado).

**Tabla 2. Diseño global del estudio**

Procedimientos	T0	T1	T2	Pacientes (n)
Selección pacientes/controles	*			Todos los pacientes
Asignación aleatoria a los grupos	*			
Datos de filiación	*			
Historia clínica	*			
Exploración física general	*			
Analítica general básica	*			
Radiografía de tórax	*			
Test cutáneos	*			
IgE total	*			
IgE específica	*			Grupos 1-2
Score síntomas/medicación de rescate			*	Grupo 1(20)
Determinación sIL-2R en cultivo				
- Determinación basal		*	*	Grupo 1 (20) Grupo 3 (20) Grupo 2A (20) Grupo 2B (20)
- PB específica		*		Grupo 1 (20)
- Priming		*		Grupo 1 (7)
- PB inespecífica metacolina		*		Grupo 1 (8)
- PB antígeno inespecífica		*		Grupo 1(8)

N: número de pacientes. PB: provocación bronquial. Los pacientes en los que se realizan los scores son los mismos en los que se hace la provocación bronquial específica. T0: fase inicial antes de la estación polínica. T1: Antes de la estación polínica. T2. Durante la estación polínica. Grupo 1: asmáticos extrínsecos a gramíneas no hiposensibilizados. Grupo 2A: asmáticos extrínsecos a gramíneas hiposensibilizados con inmunoterapia preestacional. Grupo 2B: asmáticos extrínsecos a gramíneas hiposensibilizados con inmunoterapia coestacional. Grupo 3: controles sanos.

### **3. REGISTRO DE SÍNTOMAS Y USO DE MEDICACIÓN DE RESCATE**

Los pacientes asmáticos no hiposensibilizados, que fueron asignados a la realización de la provocación bronquial específica, registraron durante la estación polínica la aparición de síntomas bronquiales y el uso de medicación de rescate.

Cada uno de los síntomas fue cuantificado de la forma siguiente:

0: ausencia de síntomas.

1: presencia de síntomas de leve intensidad.

2: presencia de síntomas moderados, que hacían necesario el uso de medicación sintomática.

3: síntomas severos, que obligaban a la utilización de la medicación sintomática y que podían interferir en la actividad diaria del paciente.

Los síntomas evaluados fueron:

+Tos.

+Disnea.

+Sibilancias.

La medicación de rescate utilizada para tratar los síntomas de broncoespasmo fueron los betamiméticos de acción corta por vía inhalatoria: Salbutamol (200 ug/puff) o Terbutalina (250 ug/puff), mediante aerosol autopropulsado. Se recomendó una dosis máxima de 2 inhalaciones cada 6 horas. Los pacientes anotaron diariamente el número de veces que usaron la medicación, asignándosele un punto a cada vez que la utilizaron.



La recogida de estos datos fue realizada por cada uno de los pacientes seleccionados, previo adiestramiento por nuestra parte, en cuanto a la forma de su cumplimentación. Para la recogida de los datos se facilitó una hoja de autoregistro (Figura 6)

Cada paciente rellenó su hoja de autoregistro durante la primavera, y nosotros, realizamos la suma de su puntuación en el total de los días registrados.

## **4. TEST CUTÁNEO**

Los test cutáneos se realizaron siguiendo la técnica del prick-test, según procedimiento descrito por Morow-Brown<sup>226</sup>. EL objetivo es reproducir localmente en la piel una reacción alérgica tipo I.

### **4.1. 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.

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

Nombre.....Número.....Mes.....

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Tos																																
Pitos																																
Ahogo																																
Medicación																																

Evaluación de las molestias: cada día valorará cada síntoma de 0 a 3, utilizando la siguiente lista de puntuación:

- 0: Ausente.
- 1: El síntoma está presente pero apenas es molesto.
- 2: El síntoma es molesto, pero no le impide realizar sus actividades diarias.
- 3: Es molesto y además le impide realizar la mayoría de sus actividades diarias.

Toma de medicación utilizada en caso de síntomas: si utilizó la medicación de rescate recomendada, anote en la tabla cada día el número de veces que necesitó utilizarla. Si precisó otra medicación, anótela a continuación.

Necesitó tomar \_\_\_\_\_ Los días \_\_\_\_\_

Necesitó tomar \_\_\_\_\_ Los días \_\_\_\_\_

Necesitó tomar \_\_\_\_\_ Los días \_\_\_\_\_

**OBSERVACIONES:** Anotar otras incidencias que pueden modificar la presencia de síntomas, por ejemplo, toma de medicamentos, procesos febriles, etc. Si es posible, señalar los días.

Figura 6. Hoja de autoregistro.

El material requerido es el siguiente:

- Algodón hidrófilo.
- Alcohol etílico de 96°.
- Rotulador para marcar la piel.
- Lancetas de puntura específicas para esta técnica, fabricadas por Dome-Hollister-Stier®.
- Batería de antígenos diagnósticos comerciales para "prick" de los laboratorios Alergia e Inmunología Abelló.
- Controles negativos (PBS) e histamina al 1/100 (los dos a una concentración 1mg/ml).
- Papel secante.

#### **4.2. ANTIGENOS PARA TEST CUTÁNEO**

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

-Ácaros:

- +Dermatophagoides pteronyssinus.
- +Dermatophagoides farinae.
- +Lepidoglyphus destructor.
- +Acarus siro.

-Hongos:

- +*Alternaria alternata*.
- +*Cladosporium herbarum*.
- +*Aspergillus*.

-Pólenes:

- +Mezcla de gramíneas silvestres.
- +*Phragmites communis*.
- +*Cynodon dactylon*.
- +*Secale cereale*.
- +*Parietaria judaica*.
- +*Rumex*.
- +*Chenopodium album*.
- +*Artemisia vulgaris*.
- +*Olea europaea*.

-Epitelios:

- +Perro
- +Gato

Estos extractos se comercializan a una concentración de 100 BU/ml.

## 5. RECOGIDA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

Se realizaron en cada una de las 3 fases del estudio, procediéndose a venoclisis de un vaso venoso periférico, extrayéndose las distintas necesidades según las determinaciones a realizar:

- a. 5 cc en tubo anticoagulado con EDTA, para la realización de la fórmula y el recuento leucocitario, mediante sistema Coulter Co., siendo realizado en el laboratorio central de Hospital Virgen Macarena.

La muestra sanguínea restante recogida, fue inmediatamente trasladada al servicio de Alergología e Inmunología clínica procediéndose:

- b. 5 cc, no conteniendo anticoagulante, se centrifugo durante 10 minutos a 3000 rpm. La fracción sérica obtenida fue almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , separándose varias alícuotas, para la posterior determinación de IgE total y específica.
- c. 10 cc, se introdujeron en un tubo que contenía 10 U/ml de heparina sódica. Con esta fracción se realizaron los cultivos de células mononucleares.

## 6. DETERMINACIÓN DE IgE TOTAL E IgE ESPECÍFICA<sup>227</sup>

Se determinó mediante la técnica CAP System® de Pharmacia, Esta técnica es un método *in vitro* basado en tecnología inmunoCAP para la determinación en fase sólida de la IgE presente en el 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 inmunoCAP; 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 inmunoCAP un segundo anticuerpo anti-IgE, esta vez marcado con una 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 mediante en un fluorómetro.

Los reactivos empleados para esta técnica son:

- Anti-IgE-enzima, beta-galactosidasa (antisuero de conejo).
- Solución de lavado: Tween 20 al 0.05% en tampón PBS.
- Solución de desarrollo (substrato): 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosidasa.
- Solución de parada (stop): ácido sulfúrico 2N.
- Estándares: Soluciones con IgE a concentraciones conocidas: 0.25, 0.7, 3.5, 17.5, 50, 100 KU/l.
- InmunoCAP anti-IgE (utilizados para la determinación de IgE total y para los estándares), e inmunoCAP con anti-IgE específica para alérgenos 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 solo 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 µl tanto de los estándares como de las muestras.

-Una vez concluido 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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. Este, a su vez, procesa esos datos y calcula las concentraciones de IgE mediante extrapolación a partir de la denominada curva estándar, construida con los valores obtenidos para los estándares. Las concentraciones quedan expresadas en kU/l.

## **7. ESPIROMETRÍA**

Para la realización de la espirometría, se siguieron las recomendaciones de la American Thoracic Society<sup>225, 228</sup>. Inicialmente, los pacientes fueron instruidos hasta que fueron capaces de realizar maniobras técnicamente correctas y con FEV<sub>1</sub> repetible (variaciones < 5% entre las 3 mejores) Se eligió como mejor maniobra aquella que mostraba valores de FEV<sub>1</sub> y FVC más elevados.

Como valores de referencia se utilizaron los de Crapo et al<sup>229</sup> para sujetos menores de 25 años y los de CECA para pacientes de edad igual o superior a 25 años<sup>230</sup>.

Para la realización de la espirometría los fármacos se suspendieron durante los periodos que se detallan para la exploración con metacolina.

## **8. PROTOCOLO DEL TEST DE HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL CON METACOLINA**

Para la realización de la prueba de provocación con metacolina, utilizamos la metodología descrita por Prieto<sup>231</sup>, con pequeñas modificaciones, y desarrollamos la técnica en un neumotacógrafo conectado a un ordenador Jaeger.

Previamente a la realización del test de metacolina se tienen en cuenta distintos factores que pueden influir:

-Se suspende la medicación: Los beta 2-inhalados, teofilinas rápidas y bromuro de ipatropio, 12 horas antes de realizar el test; los beta 2 orales y las teofilinas retardadas se suspenden 24 horas antes; el nedocromil, cromoglicato y ketotifeno 48 horas antes; los antihistamínicos se suspenden 72 horas antes y los corticoides inhalados y orales hasta dos semanas antes de la realización del test.

-Se instruye al enfermo para realizar bien las maniobras encaminadas a una buena ejecución de la técnica espirométrica y se escogen aquellos enfermos que presenten un FEV<sub>1</sub> superior al 80% y el índice de Tiffeneau superior al 70%<sup>232</sup>.

-Exposición al alérgeno: se escogen para la realización del test una época que no sea otoño ni la primavera, máxima actividad en los pólenes.

Con los enfermos que superan estos requisitos proseguimos el estudio; para ello damos a inhalar 2 cc de una solución que lleva buffer fosfato salino (PBS) en un nebulizador Hudson conectado a una botella de aire comprimido, durante dos minutos, haciendo respirar al enfermo a volumen corriente mediante una boquilla y teniendo ocluida la nariz con una pinza.

Es fundamental emplear siempre el mismo flujo de entrada para la alimentación del nebulizador para que siempre el gasto sea el mismo. Nosotros utilizamos el nebulizador Hudson conectado a un flujo de unos 6 L/minuto obteniendo un gasto aproximado de 0,190 +/- 0,02 ml/minuto. Posteriormente repetimos tres espirometrías a los dos minutos de la inhalación y tomamos la mejor. Si el descenso del FEV<sub>1</sub> no es superior al 20%, proseguimos con el test.

Se parte de una dilución madre de clorhidrato de metacolina (laboratorios Sigma Chemical) en tampón salino (PBS), a un pH de 7,2 que está a una concentración de 25 mgrs/ml. A partir de ella se realizan diluciones a la mitad obteniendo con ello concentraciones de: 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.095 mgr/ml. Estas diluciones se realizan diariamente para evitar la pérdida de actividad de la metacolina.

Vamos administrando distintas concentraciones de 2 cc de una solución de metacolina que se inhala a volumen corriente, empezando en primer lugar con la menor, realizando espirometrías a los dos minutos, tomando la mejor de ellas, suspendiendo la exploración cuando se objetiva un descenso mayor o igual del 20% en el FEV<sub>1</sub>, o cuando llegamos a la concentración máxima.

Tras completar la exploración con metacolina se administran 200 mcgr de salbutamol inhalado a aquellos pacientes que mostraron un deterioro del FEV<sub>1</sub>>10%.

Posteriormente calculamos la PC<sub>20</sub> (concentración de metacolina que produce un descenso del FEV<sub>1</sub> de un 20%) como expresión del grado de hiperreactividad bronquial. Para calcular la PC<sub>20</sub> metacolina se tienen en cuenta las fórmulas de interpolación lineal<sup>237</sup>.

$$PC_{20} = \frac{(20-R1) (C2-C1)}{(R2-R1)} + C1$$

Donde:

C1: concentración de agonista que produce una caída del FEV<sub>1</sub> inmediatamente menor al 20%.

C2: concentración de agonista que produce una caída del FEV<sub>1</sub> inmediatamente mayor al 20%.

R2 y R1: Caídas del FEV<sub>1</sub> (en %) producidas por C2 y C1 respectivamente.

Las muestras sanguíneas se tomaron antes de iniciar la provocación y 24 horas tras la realización de la misma.

## **9. PROTOCOLO DEL TEST DE PROVOCACIÓN INHALATIVO ALÉRGICO ESPECÍFICO Y DEL TEST ALÉRGICO INESPECÍFICO**

La metodología empleada es la técnica de Chai con ciertas modificaciones<sup>234</sup>. Previamente realizamos un prick con el antígeno con el que vamos a hacer la prueba inhalativa. Para la provocación antígeno inespecífica con *D. Pteronyssinus*, utilizamos extractos de la casa Leti, que lo suministra liofilizado, y que una vez reconstituido en disolvente presenta una máxima actividad biológica de 100 HEP, es decir 100000 U.B.; Para la provocación específica con la gramínea *Phleum* administramos extractos de la casa Arístegui, siendo la actividad biológica máxima de 11850 U.B. Con cada uno de los antígenos con los que hemos realizado las pruebas, utilizamos extractos pertenecientes al mismo lote de producción.

Para ello tomamos los diferentes extractos y hacemos diluciones inferiores de 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 sobre la concentración máxima, practicando en la cara anterior del antebrazo distintos pricks con estas concentraciones, utilizando como control negativo y positivo, PBS e histamina a una concentración de 1 mg/ml. Se considera positivo el prick cuyo diámetro mayor de la pápula sea mayor a 3 mm.

Al paciente que vamos a explorar se le efectúa antes una espirometría basal y se le aplica la misma técnica que la utilizada en la provocación bronquial con metacolina. La concentración de antígeno elegida es una dilución 100 veces menor de aquella que provocó en el prick una pápula similar a la de la histamina, realizada según técnica de titulación a punto final.

Para la inhalación de antígeno se utiliza un nebulizador Hudson conectado a una botella de aire comprimido con un flujo de salida de unos 6 L/minuto, y con un gasto aproximado de 0,190 +/- 0,02 ml/minuto. El volumen inhalado fue para cada concentración de antígeno o de diluyente de 2 cc y se administra inhalándolo a volumen corriente durante 2 minutos.

A continuación realizamos 3 espirometrías seriadas durante los primeros 2, 5, 10, 15, 20 minutos, obteniendo también el PEF con el peak-flow meter Mini Wright, tomando siempre el mejor de 3 intentos. Si no hay un descenso significativo del FEV<sub>1</sub>, proseguimos la inhalación a otra concentración mayor, hasta llegar a la máxima dosis o a un descenso del FEV<sub>1</sub> superior al 20%.

Mantenemos al enfermo en observación durante 7 horas haciendo maniobras espirométricas horarias en las que registramos las variaciones del FEV<sub>1</sub>, y del PEF; de esta manera podemos comprobar si el enfermo presenta sólo respuesta inmediata o si la tiene tardía.

La monitorización posterior se consigue en casa con mediciones cada 2 horas, durante las primeras 24 horas, respetando las horas de sueño, del PEF con el peak-flow meter Mini-Wright. Se consideran reacciones tardías aquellas que aparecen horas después de la inhalación del antígeno y que son objetivadas mediante descensos del FEV<sub>1</sub> igual o superior al 20% o descensos en la medición del PEF superior al 25%.

Los resultados son llevados a un papel semilogarítmico, obteniendo una curva dosis-respuesta donde se determina la PD<sub>20</sub> antigénica o concentración de sustancia capaz de inducir una caída del 20% en el FEV<sub>1</sub>. El resultado se da en Unidades Biológicas, haciendo la salvedad de que la equivalencia entre las del laboratorio Arístegui y Leti, nunca se han llevado a cabo, motivo por el que no son comparables entre sí.

Las muestras sanguíneas se tomaron antes de iniciar la provocación y 24 horas tras la realización de la misma.

## **10. CLASIFICACIÓN SEGÚN HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL**

### **10.1. CLASIFICACIÓN SEGÚN HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL INESPECÍFICA**

Según el test de hiperreactividad realizado con metacolina hemos dividido a los pacientes en<sup>231</sup>:

-Pacientes con HRBI - : PC20 mayor a 18 mgrs de metacolina.

-Pacientes con HRBI+ : PC20 menor o igual a 18 mgrs de metacolina.

### **10.2. CLASIFICACIÓN SEGÚN HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL ESPECÍFICA**

Según como sea la respuesta bronquial a la inhalación de un antígeno hemos dividido a los pacientes en:

-Pacientes con HRBE -: Enfermos con respuesta, tras la provocación bronquial antigénica, negativa.

-Pacientes con HRBE +: Pacientes con respuesta, tras la inhalación de antígeno, positiva. Dentro de éste último los subdividimos en pacientes con respuesta inmediata y con respuesta tardía.

## **11. PRIMING**

La técnica priming consiste en la realización de una provocación antígeno específica, durante varios días consecutivos, con una dosis antigénica que no produzca broncoconstricción (la concentración de antígeno elegida es una dilución 100 veces menor de aquella que provocó en el prick una pápula similar a la de la histamina). La técnica es similar a la descrita en el apartado previo, utilizando cada día solamente la dilución indicada anteriormente.

Durante 5 días consecutivos se realizó la misma maniobra. Las muestras sanguíneas se tomaron antes de iniciar la técnica y al quinto día de iniciada la misma.

## **12. CULTIVOS CELULARES DE CÉLULAS MONONUCLEARES**

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 tres 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 dos semanas, una vez adicionado.
- No utilizar material esterilizado con óxido de etileno, para eludir el efecto tóxico de dicha sustancia sobre las células.

## **12.1. PROCEDIMIENTO**

### **12.1.1. 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  $\frac{1}{2}$  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 (4cc. 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 minutos a temperatura ambiente.

Después de esto, deberían distinguirse diferentes fases en el contenido del tubo: en el fondo quedarían los hematíes; sobre estos, 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 minutos, 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.

### 12.1.2. Contaje de células.

-En un primer momento debemos mezclar, en un pocillo de una placa utilizada al efecto, 100 microlitros de la suspensión celular y 100 microlitros de azul de Tripán. Esta mezcla se deja reposar unos minutos para que actúe la tinción.

-Mientras tanto, podemos preparar la cámara de contaje 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 ( $3 \times 10^6$  células / ml.). Para ello, primero calculamos la concentración de células que tenemos en la suspensión que hemos teñido (células/ml):

$$X = [\text{contaje (nº)} / \text{vol. de la cámara (ml)}] \times 2 \text{ (dilución al teñir)}$$

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.

### **12.1.3. 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 microlitros tenemos  $3 \times 10^5$  células en cada pocillo).

-Una vez sembrada la placa, llevamos cada pocillo a un volumen final de 300 microlitros 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 CO<sub>2</sub>.

## **12.2. 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.

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 microlitros de la suspensión celular ajustada a la concentración establecida previamente, de forma que la cantidad aproximada de linfocitos por pocillo era de  $3 \times 10^5$ .

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

Una vez sembrada toda la placa, añadimos el mitógeno. El mitógeno utilizado fue PHA a una concentración en el pocillo de 10  $\mu\text{g/ml}$ .

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 CO<sub>2</sub> y en la oscuridad.

La recolección de los sobrenadantes la llevamos a cabo a las 24 horas del cultivo, depositando el material así obtenido en alícuotas. 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.

### **13. DETERMINACIÓN DEL CD25 SOLUBLE**

Se determinó mediante ensayo de inmunoenzimología “tipo sándwich” (EIA) (Cellfree CD25 test kit, T cell Sciences, Inc).

De forma resumida, el ensayo consiste en lo siguiente. Un anticuerpo monoclonal anti-CD25 se fija en micropocillos. Las muestras y estándares se introducen en los pocillos, seguido inmediatamente de la adición de un enzima conjugado con un anticuerpo monoclonal anti-CD25. El CD25 soluble de las muestras o estándares se une al anticuerpo fijado en los pocillos mientras el anticuerpo conjugado se une a un segundo y distinto epítipo de la molécula de sCD25, completando el sándwich. Una vez lavados, se añade a los pocillos una solución cromógena proporcionando una coloración final proporcional a la cantidad de sCD25 presente en la muestra. La reacción se detiene con una solución stop y se realiza la lectura con una absorbancia de 490 nm. La preparación de la curva estándar permite calcular los valores desconocidos.

#### **13.1 MATERIAL**

Cada Cellfree IL-2R Test Kit contiene reactivos suficientes para la realización de 96 determinaciones. Cada Kit incluye:

- Placa microtiter con 96 pocillos donde se ha fijado el anticuerpo monoclonal murino frente al CD25 humano.

- Anticuerpo anti IL-2R conjugado: 12 ml anticuerpo monoclonal murino anti IL-2R humano conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), en una solución tamponada con proteínas séricas bovinas y thimerosal.

- Diluyente para las muestras: el vial contiene 12 ml de proteínas bovinas, IgE murina, gentamicina y thimerosal.

-Estándares de IL-2R (6 viales): cada uno de ellos contiene IL-2R recombinante humano liofilizado, excepto el estándar cero. Se acompaña de solución tamponada para su reconstitución. Cada vial posee una concentración determinada para cada nivel de estándar.

-Controles de IL-2R (2 viales): cada uno de ellos contiene IL-2R recombinante humano, en solución tamponada con proteínas séricas bovinas y thimerosal.

-Tabletas de cromógeno OPD (6 pastillas): contienen ortofenilendiamina en un vehículo inerte.

-Diluyente de sustrato: un vial con 30 ml de peróxido de urea (a una concentración de 5.3 mM/l) y thimerosal en solución tamponada.

-Buffer PBS: un paquete conteniendo sales suficientes para la preparación de un litro de solución tampón.

-Solución surfactante: contiene un vial con 1.5 ml de una solución de surfactante al 50%.

-Cubiertas adhesivas de plástico para la placa.

-Solución de parada: ácido sulfúrico 2N.

-Micropipetas de precisión con posibilidad de dispensar volúmenes de 10, 50 y 100 microlitros.

-Multipipetas regulables de 50 a 200 microlitros.

-Recipientes de laboratorio para la preparación de los reactivos.

-Fotómetro con filtro para una absorbancia de 490 nm.

-Plataforma rotatoria a 150 +/- 10 rpm.

-Agua destilada.

-Estufa de aire para incubar a temperatura constante de 37 +/- 2°C.

## **13.2. MÉTODO**

### **13.2.1. Recolección de muestras.**

Son válidos para el ensayo suero o plasma citratado y el sobrenadante de cultivos. No se puede usar plasma con EDTA o heparinizado. Nosotros empleamos sobrenadante de cultivo de células mononucleares estimuladas con PHA que se conservó a -20°C hasta su procesamiento. Antes de ser utilizadas, se dejó que alcanzaran la temperatura ambiente de forma lenta y con agitación suave.

### **13.2.2. Preparación de los reactivos.**

Excepto la solución cromógena, el resto de los reactivos de deben preparar antes de comenzar el ensayo.

1. Solución de lavado: se disuelve el contenido del paquete conteniendo sales PBS en un litro de agua destilada y se añade 1.0 ml de solución surfactante, mezclándolo hasta su disolución completa.

2. Estándares: los seis estándares liofilizados se reconstituyen con 0.5 ml de agua destilada para cada vial.
3. Solución de cromógena: se prepara 15 minutos antes de su uso. Para una placa con 96 pocillos se emplean 4 tabletas de cromógeno. Por cada tableta se añaden 5 ml del diluyente sustrato y se agita hasta la disolución completa.
4. Solución de parada: se añaden con cuidado 5.8 ml de ácido sulfúrico a 80 ml de agua destilada. Posteriormente, se añade agua destilada hasta un volumen total de 100 ml.

### **13.2.3. Protocolo del ensayo.**

-Colocar a temperatura ambiente todos los reactantes.

-Pipetear en cada pocillo 50 microlitros de los estándares, de los controles y de las muestras por duplicado, y en orden correlativo siguiendo la numeración de la placa.

-Añadir 100 microlitros de anticuerpo anti-IL-2R conjugado con peroxidasa en cada pocillo. Cubrir la placa con una lámina de plástico y mantenerla a temperatura ambiente durante 150 minutos en agitación a 150 rpm.

- Aspirar la solución de los pocillos y lavar tres veces con 350 microlitros de la solución de lavado por pocillo, con aspiración entre los lavados.

-Pipetear en cada pocillo 100 microlitros de la solución de sustrato cromógeno. Incubar a temperatura ambiente 30 minutos.

-Pipetear 50 microlitros de la solución de parada en todos los pocillos y agitar suavemente la placa.



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

#### **13.2.4. Resultados.**

La concentración de sIL-2R presente en cada pocillo se expresa en unidades por ml (U/ml). Se definen 1000 unidades por mililitro a la cantidad de sIL-2R presente en 1.0 ml de la preparación referencia de linfocitos de sangre periférica de la casa que comercializa el Kit (T cell Diagnostic) estimulados con PHA.

### **14. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA**<sup>235-239</sup>

Para el análisis estadístico utilizamos el programa informático Statgraphics Plus 5.1.

Hemos aplicado el test de Kolmogorov-Smirnov con el fin de evaluar la bondad de ajuste de la muestra a una distribución normal (gausiana). En nuestro caso, como la muestra no se ajustaba a una distribución normal, se utilizaron los test no paramétricos.

Para el estudio descriptivo de las variables analizadas, utilizamos la proporción o porcentaje para las variables cualitativas, y los valores máximo y mínimo, percentil 25 y 75, media aritmética +/- desviación típica, error estándar de la media y mediana para la descripción de las variables cuantitativas.

Para la comparación de variables cuantitativas se utilizó la U de Mann Whitney (dos muestras independientes), el test de los rangos de Wilcoxon para datos apareados (dos muestras apareadas) y el test de Kruskal Wallis (más de dos muestras independientes). Para estudiar la relación entre variables cuantitativas se utilizó el coeficiente de correlación Rho de Spearman.

En todos los casos, se adoptó como nivel de significación estadística  $p < 0.05$  y un intervalo de confianza del 95%.

## **VI. RESULTADOS**



## 1. INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Analizamos los resultados en tres apartados: en el primero de ellos se exponen las tablas de pacientes y valores de las variables analizadas en cada uno de los grupos (tablas 3-10); en el segundo apartado se realiza la estadística descriptiva de las distintas variables descritas en cada grupo (tablas 11-14 y figuras 7-21); en el tercer apartado se realiza la estadística analítica (figuras 22-47).

En las tablas de la estadística descriptiva de las distintas variables para cada uno de los grupos, en las variables cualitativas se indica el número absoluto y la proporción. Para las variables cuantitativas se indican los valores máximos y mínimos, percentil 25 y 75, la media  $\pm$  la desviación estándar, error estándar de la media y la mediana como se expone en el esquema:

Valor mínimo-valor máximo
Percentil 25-75
Media $\pm$ desviación estándar
Error estándar de la media
Mediana

### 1.1 GRUPOS

*Grupo asma*: pacientes asmáticos extrínsecos sensibles a polen de gramíneas, no inmunizados.

*Grupo inmunoterapia coestacional*: pacientes asmáticos extrínsecos sensibles a polen de gramíneas, inmunizados con inmunoterapia coestacional durante 3 años.

*Grupo inmunoterapia preestacional*: pacientes asmáticos extrínsecos sensibles a polen de gramíneas, inmunizados con inmunoterapia preestacional durante 3 años.

*Grupo controles sanos*: no asmáticos.

*Grupo provocación específica*: pacientes asmáticos extrínsecos, sensibles a polen de gramíneas, no inmunizados, sometidos a provocación bronquial específica.

*Grupo respuesta inmediata:* subgrupo del anterior; pacientes asmáticos extrínsecos, sensibles a polen de gramíneas, no inmunizados, sometidos a provocación bronquial específica que presentan reacción inmediata.

*Grupo respuesta dual:* subgrupo del anterior; pacientes asmáticos extrínsecos, sensibles a polen de gramíneas, no inmunizados, sometidos a provocación bronquial específica que presentan reacción dual.

*Grupo priming:* pacientes asmáticos extrínsecos, sensibles a polen de gramíneas, no inmunizados, sometidos a priming bronquial específico.

*Grupo metacolina:* pacientes asmáticos extrínsecos, sensibles a polen de gramíneas, no inmunizados, sometidos a provocación bronquial inespecífica con metacolina.

*Grupo provocación antígeno inespecífica:* pacientes asmáticos extrínsecos, sensibles a polen de gramíneas, no inmunizados, sometidos a provocación bronquial antígeno inespecífica con antígeno al cual no son sensible (*D pteronyssinus*).

## 2. TABLAS DE PACIENTES POR GRUPOS

**Tabla 3. Niveles de sIL-2R en controles sanos antes de la primavera y durante la primavera (N: 20).**

N	Edad	Sexo	IgE total	sIL-2R T1	sIL-2R T2
1	28	M	26	415	514
2	27	M	54	425	516
3	25	H	119	560	564
4	29	H	70	472	625
5	21	M	105	478	461
6	33	H	52	555	525
7	19	M	145	534	494
8	42	M	83	430	540
9	29	H	29	542	632
10	33	H	9	515	544
11	20	H	46	547	540
12	22	M	90	572	325
13	25	H	114	400	556
14	19	M	43	428	528
15	30	H	10	580	382
16	23	H	86	556	517
17	50	M	70	384	452
18	22	M	100	421	466
19	18	H	14	423	542
20	20	H	32	456	544

N (nº de paciente), edad (años), sexo (M: mujer, H: hombre), IgE total (KU/l), sIL-2R (U/ml), T1 y T2 hacen referencia a los tiempos antes de la primavera y durante la primavera respectivamente.

**Tabla 4. Niveles de sIL-2R en pacientes asmáticos extrínsecos sensibles a polen de gramíneas, no inmunizados, antes de la primavera y durante la primavera (N: 20)**

N	Edad	Sexo	IgE total	IgE es- pecíf.	Años de asma	sIL-2R T1	sIL-2R T2
1	36	M	744	100	7	528	2600
2	25	H	466	68,7	5	452	3580
3	21	M	541	86,1	7	515	5260
4	42	H	243	91,2	2	466	4675
5	26	M	1435	64,6	3	425	5894
6	35	H	749	39,2	3	516	4876
7	31	H	959	13,9	2	400	5321
8	27	M	1181	22,6	10	570	4895
9	24	H	409	27,4	1	517	4632
10	21	H	709	15,4	4	405	5789
11	20	H	450	29,8	3	578	3984
12	34	M	579	7	4	312	2800
13	42	M	145	15,4	2	516	5687
14	21	M	191	10,3	10	585	3689
15	19	M	227	23,7	7	522	5648
16	43	H	362	62,7	2	599	4632
17	19	H	196	73,8	2	587	4135
18	23	M	269	17,6	2	635	3954
19	34	M	233	100	3	625	4723
20	31	H	133	100	1	592	4231

N (nº de paciente), edad (años), sexo (M: mujer, H: hombre), IgE total y específica (KU/l), años de asma (años de evolución de asma), sIL-2R (U/ml), T1 y T2 hacen referencia a los tiempos antes de la primavera y durante la primavera respectivamente.



**Tabla 5. Niveles de sIL-2R en pacientes asmáticos extrínsecos sensibles a polen de gramíneas, inmunizados con inmunoterapia coestacional durante 3 años, antes de la primavera y durante la primavera (N: 20)**

N	Edad	Sexo	IgE total	IgE es- pecif.	Años de asma	sIL-2R T1	sIL-2R T2
1	39	H	208	38,6	7	478	312
2	20	H	947	22,9	10	525	325
3	23	H	1500	32,1	7	525	414
4	21	M	235	83,4	6	436	480
5	19	H	119	27,2	6	421	689
6	32	M	1063	100	5	350	450
7	44	M	131	15,4	5	569	652
8	26	H	385	57	4	536	301
9	30	H	732	48	8	565	735
10	22	M	394	23,2	9	500	750
11	24	H	197	44,5	10	352	312
12	36	H	158	25,1	6	564	720
13	35	M	816	100	10	400	674
14	26	M	332	55,7	8	512	725
15	36	M	105	73,8	7	547	735
16	28	H	624	42,8	5	532	325
17	27	H	291	11,7	7	566	458
18	32	M	209	63,8	8	562	578
19	37	H	120	29,7	9	524	456
20	24	M	154	100	5	491	658

N (nº de paciente), edad (años), sexo (M: mujer, H: hombre), IgE total y específica (KU/l), años de asma (años de evolución de asma), sIL-2R (U/ml), T1 y T2 hacen referencia a los tiempos antes de la primavera y durante la primavera respectivamente.

**Tabla 6. Niveles de sIL-2R en pacientes asmáticos extrínsecos sensibles a polen de gramíneas, inmunizados con inmunoterapia preestacional durante 3 años, antes de la primavera y durante la primavera (N: 20)**

Paciente	Edad	Sexo	IgE total	IgE es- pecíf.	Años de asma	sIL-2R T1	sIL-2R T2
1	33	H	136	14,6	7	489	1569
2	31	H	601	15,7	8	517	989
3	20	M	644	31,7	7	568	2356
4	34	H	211	58,3	4	325	1256
5	37	H	484	90,4	4	561	1789
6	27	M	1554	74,6	7	536	965
7	24	M	400	100	5	415	878
8	30	H	907	29	5	456	1658
9	30	H	251	87,4	8	450	1236
10	36	H	145	96,6	5	525	1789
11	21	M	640	21,5	6	570	1569
12	29	M	577	30,1	5	416	1236
13	39	H	772	12,5	10	600	997
14	20	H	290	13,2	7	516	1369
15	35	M	174	37,9	6	435	2103
16	38	M	283	62,4	6	489	1356
17	30	H	326	86,6	5	542	1458
18	35	M	577	100	8	389	1658
19	20	M	208	70,2	7	456	1736
20	30	H	947	69	6	478	1256

N (nº de paciente), edad (años), sexo (M: mujer, H: hombre), IgE total y específica (KU/l), años de asma (años de evolución de asma), sIL-2R (U/ml), T1 y T2 hacen referencia a los tiempos antes de la primavera y durante la primavera respectivamente.

**Tabla 7. Modificación de los niveles de sIL-2R en pacientes asmáticos extrínsecos, sensibles a polen de gramíneas, no inmunizados, sometidos a provocación bronquial específica (N: 20).**

N	Edad	Sexo	Sintoma	β2	IgE T	IgE E	Años	FEV <sub>1</sub> Inicio	PD <sub>20</sub>	% FEV <sub>1</sub>	TR	sIL-2R T1	sIL-2R T2
1	21	H	160	28	447	19	5	120	100	51,2	I	420	1356
2	24	H	484	73	641	92	3	100	500	43,4	D	591	3589
3	25	M	252	46	196	34	6	110	15	55	D	560	2594
4	18	M	224	36	1106	68	7	85	90	21	D	425	2698
5	28	H	190	36	286	69	2	110	15	38,1	I	468	2456
6	30	H	48	9	210	91	2	100	611	36,4	I	456	1236
7	24	M	178	29	168	35	2	110	42	40,3	I	545	1569
8	32	M	160	26	182	45	2	97	91	28	I	522	1478
9	27	H	428	76	268	35	1	86	45	34,6	D	436	3568
10	37	H	260	45	1370	16	6	89	320	31,4	D	531	2987
11	32	M	150	30	625	35	7	97	160	32	I	461	1598
12	40	M	170	27	450	25	2	107	550	20	I	524	2148
13	36	M	78	6	418	19	1	92	340	46,4	I	526	1589
14	24	M	249	42	760	36	2	104	88	32,1	D	542	2598
15	28	H	45	5	450	102	3	112	1000	26,9	I	420	1598
16	22	H	179	32	281	50	7	94	400	26,4	I	514	1365
17	41	H	382	66	760	90	2	91	18	30,6	D	569	3214
18	30	M	92	16	296	34	9	89	42	25,1	I	594	1259
19	45	H	170	25	780	56	7	92	600	36,2	I	325	1158
20	35	H	280	51	450	61	4	86	92	29,4	D	569	3214

N (nº paciente), edad (años), sexo (M:mujer, H:hombre), sintoma (puntuación de sintomatología), β2 (puntuación de utilización de beta 2 miméticos de corta acción de rescate), IgE T (IgE total, KU/l), IgE E (Ig E específica, KU/l), años (años de evolución de asma), FEV<sub>1</sub> inicio (FEV<sub>1</sub> inicial, l/seg), PD<sub>20</sub> (unidades biológicas), % FEV<sub>1</sub> (porcentaje de caída del FEV<sub>1</sub> sobre el basal), TR (tipo de respuesta; I: inmediata; D: dual), sIL-2R (U/ml), T1 y T2 hacen referencia a los tiempos antes de la provocación y 24 horas tras la provocación respectivamente.

**Tabla 7-A. Modificación de los niveles de sIL-2R en pacientes asmáticos extrínsecos, sensibles a polen de gramíneas, no inmunizados, sometidos a provocación bronquial específica que presentan una respuesta inmediata (N: 12).**

N	Síntomas	$\beta 2$	sIL-2R T1	sIL-2R T2
1 (1)	160	28	420	1356
2 (5)	190	36	468	2456
3 (6)	48	9	456	1236
4 (7)	178	29	545	1569
5 (8)	160	26	522	1478
6 (11)	150	30	461	1598
7 (12)	170	27	524	2148
8 (13)	78	6	526	1589
9 (15)	45	5	420	1598
10 (16)	179	32	514	1365
11 (18)	92	16	594	1259
12 (19)	170	25	325	1158

EXTRACTO DE TABLA 5. N (nº paciente, entre paréntesis el número que ocupa en la tabla 5), síntoma (puntuación de sintomatología),  $\beta 2$  (puntuación de utilización de beta 2 miméticos de corta acción de rescate), sIL-2R (U/ml), T1 y T2 hacen referencia a los tiempos antes de la provocación y 24 horas tras la provocación respectivamente.

**Tabla 7-B. Modificación de los niveles de sIL-2R en pacientes asmáticos extrínsecos, sensibles a polen de gramíneas, no inmunizados, sometidos a provocación bronquial específica que presentan una respuesta dual (N: 8)**

Paciente	Síntomas	$\beta 2$	sIL-2R T1	sIL-2R T2
1 (2)	484	73	591	3589
2 (3)	252	46	560	2594
3 (4)	224	36	425	2698
4 (9)	428	76	436	3568
5 (10)	260	45	531	2987
6 (14)	249	42	542	2598
7 (17)	382	66	569	3214
8 (20)	280	51	569	3214

EXTRACTO DE TABLA 5. N (nº paciente, entre paréntesis el número que ocupa en la tabla 5), síntoma (puntuación de sintomatología),  $\beta 2$  (puntuación de utilización de beta 2 miméticos de corta acción de rescate), sIL-2R (U/ml), T1 y T2 hacen referencia a los tiempos antes de la provocación y 24 horas tras la provocación respectivamente.

**Tabla 8. Modificación de los niveles de sIL-2R en pacientes asmáticos extrínsecos, sensibles a polen de gramíneas, no inmunizados, sometidos a priming bronquial específico (N: 7).**

N	Edad	Sexo	IgE total	IgE espe- cif.	Años de asma	sIL-2R T1	sIL-2R T2
1	30	H	311	28,8	2	512	1568
2	29	H	500	14,6	3	540	2356
3	19	M	319	94,7	2	467	2136
4	34	M	194	12,7	8	400	2459
5	28	H	269	18,9	2	598	2698
6	26	M	793	11,1	3	420	1987
7	30	H	756	100	4	512	1203

N (nº de paciente), edad (años), sexo (M: mujer, H: hombre), IgE total y específica (KU/l), años de asma (años de evolución de asma), sIL-2R (U/ml), T1 y T2 hacen referencia a los tiempos antes del priming y a los 5 días del priming respectivamente.

**Tabla 9. Modificación de los niveles de sIL-2R en pacientes asmáticos extrínsecos, sensibles a polen de gramíneas, no inmunizados, sometidos a provocación bronquial inespecífica con metacolina (N: 8).**

N	Edad	Sexo	IgE T	IgE E	Años de asma	PC <sub>20</sub>	sIL-2R T1	sIL-2R T2
1	26	H	276	7	2	160	423	325
2	20	M	144	102	3	195	456	564
3	36	M	316	15	6	150	342	515
4	25	H	537	22	5	95	565	542
5	38	M	793	6,8	7	200	428	548
6	28	M	756	22	4	120	450	536
7	28	H	1700	48	7	170	524	528
8	50	H	519	60	5	180	534	569

N (nº de paciente), edad (años), sexo (M: mujer, H: hombre), IgE T e IgE E (IgE total y específica, KU/l), años de asma (años de evolución de asma), PC<sub>20</sub> (PC<sub>20</sub> metacolina, unidades biológicas), sIL-2R (U/ml), T1 y T2 hacen referencia a los tiempos antes de la provocación bronquial inespecífica con metacolina y 24 horas tras la provocación respectivamente.

**Tabla 10. Modificación de los niveles de sIL-2R en pacientes asmáticos extrínsecos, sensibles a polen de gramíneas, no inmunizados, sometidos a provocación bronquial antígeno inespecífica con antígeno al cual no son sensible (*D pteronyssinus*). N: 8.**

Paciente	Edad	Sexo	IgE total	IgE es-pecíf.	Años de asma	sIL-2R T1	sIL-2R T2
1	36	H	225	23	7	436	540
2	40	M	160	46	8	580	461
3	38	H	299	75	3	425	384
4	20	M	390	12	4	528	522
5	22	M	379	18,3	3	354	585
6	41	H	1115	43,2	2	575	312
7	27	H	1331	81,9	1	386	584
8	22	M	540	100	4	456	480

N (nº de paciente), edad (años), sexo (M: mujer, H: hombre), IgE total y específica (a gramíneas, KU/l), años de asma (años de evolución de asma), sIL-2R (U/ml), T1 y T2 hacen referencia a los tiempos antes de la provocación bronquial antígeno inespecífica y 24 horas tras la provocación respectivamente.

La IgE específica a *D. pteronyssinus* fue negativa (<032 KU/l) en todos los pacientes.

### 3. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA POR GRUPOS

#### 3.1. TABLAS

Tabla 11.

N: 20	Asma	Inmunoterapia coestacional	Inmunoterapia preestacional	Controles sanos
Edad (años)	19-43 21-34.5 28.7±8.07 1.8 26.5	19-44 23.5-35.5 29.05±7.05 1.58 27.5	20-39 25.5-35 29.95±6.21 1.39 30	18-50 20.5-29.5 26.75±8.14 1.82 25
Sexo H: hombre M: mujer	H 10 (50%) M 10 (50%)	H 11(55%) M 9 (45%)	H 11 (55%) M 9 (45%)	H 11 (55%) M 9 (45%)
IgE Total (KU/l)	133-1435 230-726.5 511±360.13 80.52 429	105-1500 156-678 436±387.34 86.61 263	136-1554 231-642 506.35±350.88 78.46 442	9-145 30.5-95 64.85±39.59 8.85 62
IgE específica (KU/l)	7-100 16.5-79.95 48.47±34.33 7.67 34.5	11.7-100 26.15-68.8 49.74±28.7 6.42 43.65	12.5-100 25.25-87 55.08±32.39 7.24 60.35	0
Años de asma (años)	1-10 2-6 4±2.77 0.62 3	4-10 5.5-8.5 7.1±1.86 0.42 7	4-10 5-7 6.3±1.52 0.34 6	0
sIL-2R T1 (U/ml)	312-635 459-586 517±85.12 19.03 519.5	350-569 457-554.5 497.75±69.95 15.64 524.5	325-600 442.5-539 486.65±69.75 15.59 489	384-580 424-551 484.65±66.39 14.85 475
sIL-2R T2 (U/ml)	2600-5894 3969-5290.5 4550.25±938.06 209.76 4653.5	301-750 369.5-704.5 537.45±170.07 38.03 529	878-2356 1236-1697 1461.15±386.19 86.35 1413.5	325-632 480-544 513.35±71.55 15.99 526.5

N: número de pacientes. T1 y T2 hacen referencia a los tiempos antes de la primavera y durante la primavera respectivamente.

**Tabla 12.**

	Provocación específica N: 20
Edad (años)	18-45 24-35.5 29.95±7.26 1.62 29
Sexo H: hombre M: mujer	H 11 (55%) M 9 (45%)
IgE total (KU/l)	168-1370 274.5-700.5 507.2±321.69 71.93 448.5
IgE específica (KU/l)	16-102 34-68.5 50.6±26.84 6 40.5
Años de asma (años)	1-9 2-6.5 4±2.49 0.55 3
FEV <sub>1</sub> (FEV <sub>1</sub> inicial, l/seg)	85-120 90-108.5 98.55±10.23 2.29 97
% caída FEV <sub>1</sub>	20-55 27.45-39.2 34.22±9.4 2.1 32.05
PD <sub>20</sub> (unidades biológicas)	15-1000 43.5-450 255±274.16 61.3 96
Tipo de respuesta I: inmediata D: Dual	D 8 (40%) I 12 (60%)

N (número de pacientes) % FEV<sub>1</sub> (porcentaje de caída del FEV<sub>1</sub> sobre el basal).



**Tabla 13.**

Provocación bronquial específica	Respuesta inmediata	Respuesta dual	Todos (inmediata + dual)
N	12	8	20
Síntomas	45-190 85-174 135±53.51 15.44 160	224-484 250.5-405 319.87±97.45 34.46 270	45-484 155-256 208.95±117.43 26.26 178.5
Uso beta 2	5-36 12.5-29.5 22.41±10.62 3.07 26.5	36-76 43.5-69.5 54.37±15.16 5.36 48.5	5-76 25.5-45.5 35.2±20.20 4.52 31
sIL-2R T1	325-594 438-525 481.25±71.65 20.68 491	425-541 483.5-569 527.87±62.82 22.21 551	325-594 446-552.5 499.9±70.54 15.77 523
sIL-2R T2	1158-2456 1307.5-1598 1567.5±380.81 109.93 1523.5	2594-3589 2648-3391 3057.75±405.72 143.44 3100.5	1158-3589 1421.5-2842.5 2163.6±840.03 187.83 1873

N (nº paciente), síntoma (puntuación de sintomatología), uso beta 2 (puntuación de utilización de beta 2 miméticos de corta acción de rescate), T1 y T2 hacen referencia a los tiempos antes de la provocación y 24 horas tras la provocación respectivamente.

**Tabla 14.**

	Priming	Metacolina	Provocación antígeno inespecífica
N	7	8	8
Edad (años)	19-34 26-30 28±4.65 1.76 24	20-50 25.5-37 31.37±9.51 3.36 28	20-41 22-39 30.75±8.89 3.14 31.5
Sexo H: hombre M: mujer	H: 4 (57.2%) M: 3 (42.8%)	H: 4 (50%) M: 4 (50%)	H: 4 (50%) M: 4 (50%)
Ig E total (KU/l)	194-793 269-756 448.85±241.02 91.09 319	144-1700 296-774.5 630.12±488.2 172.6 528	160-1331 262-827.5 554.87±431.71 152.63 384.5
Ig E específica (KU/l)	11.1-100 12.7-94.7 40.11±39.55 14.95 18.9	6.8-102 11-54 35.35±32.94 11.64 22	12-100 20.65-78.45 49.92±32.47 11.84 44.6
Años de asma (años)	2-8 2-4 3.42±2.14 0.81 3	2-7 3.5-6.5 4.87±1.8 0.63 5	1-8 2.5-5.5 4±2.39 0.84 3.5
PC20 metacolina (unidades biológicas)		95-200 135-187.5 158.75±36.32 12.84 165	
sIL-2R T1 (U/ml)	400-598 420-540 492.71±69.05 26.09 512	342-565 425.5-529 465.25±72.51 25.63 453	354-580 405.5-551.5 467.5±84.79 29.97 446
sIL-2R T2 (U/ml)	1203-2698 1568-2459 2058.14±523.04 197.69 2136	325-569 521.5-556 515±79.13 27.97 539	312-585 422.5-562 483.5±96.29 34.04 501

N (nº paciente), T1 y T2 hacen referencia a los tiempos antes de la provocación y 24 horas tras la provocación respectivamente (para el grupo provocado con metacolina y con antígeno inespecífico) y a los tiempos antes del priming y 5 días tras iniciar el priming respectivamente (para el grupo provocado con técnica tipo priming).

### 3.2. FIGURAS

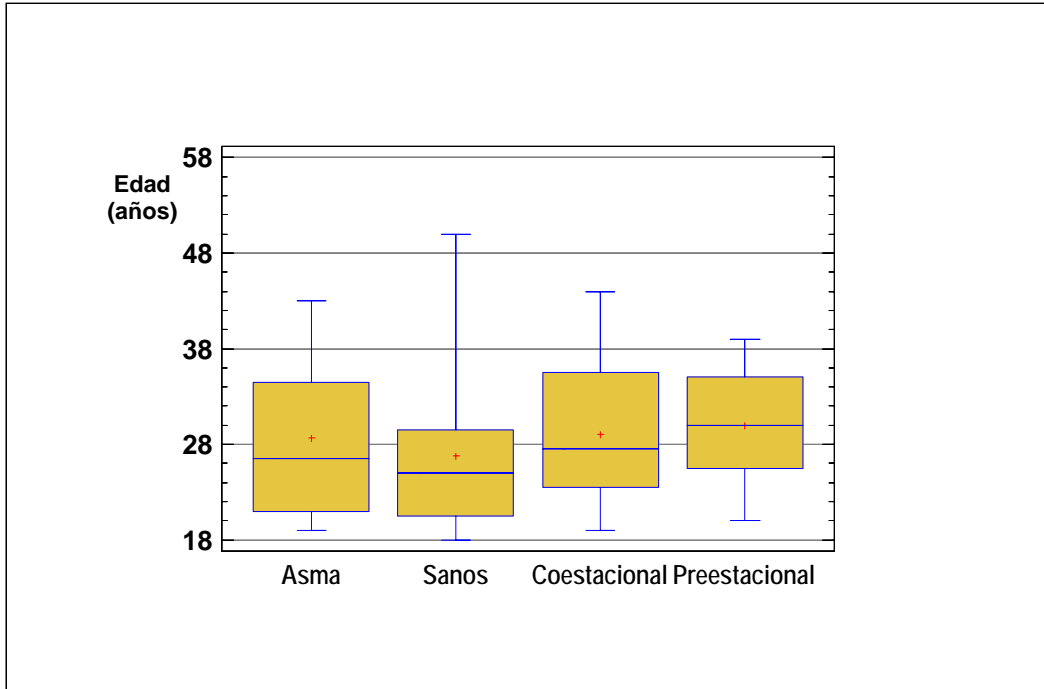


Figura 7. Edad (1).

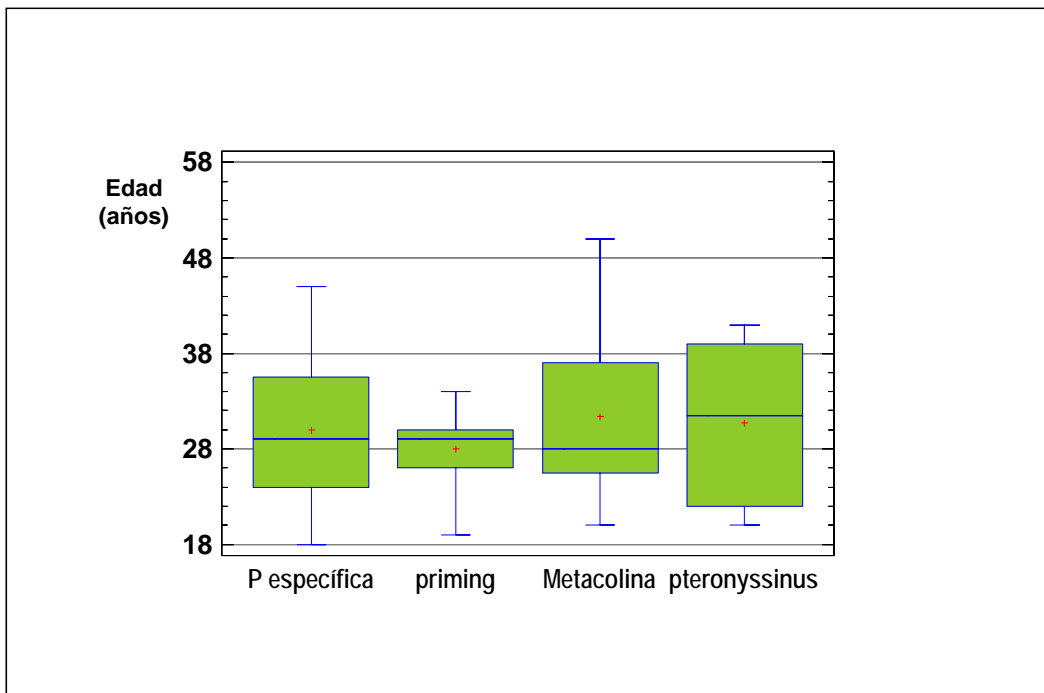


Figura 8. Edad (2).

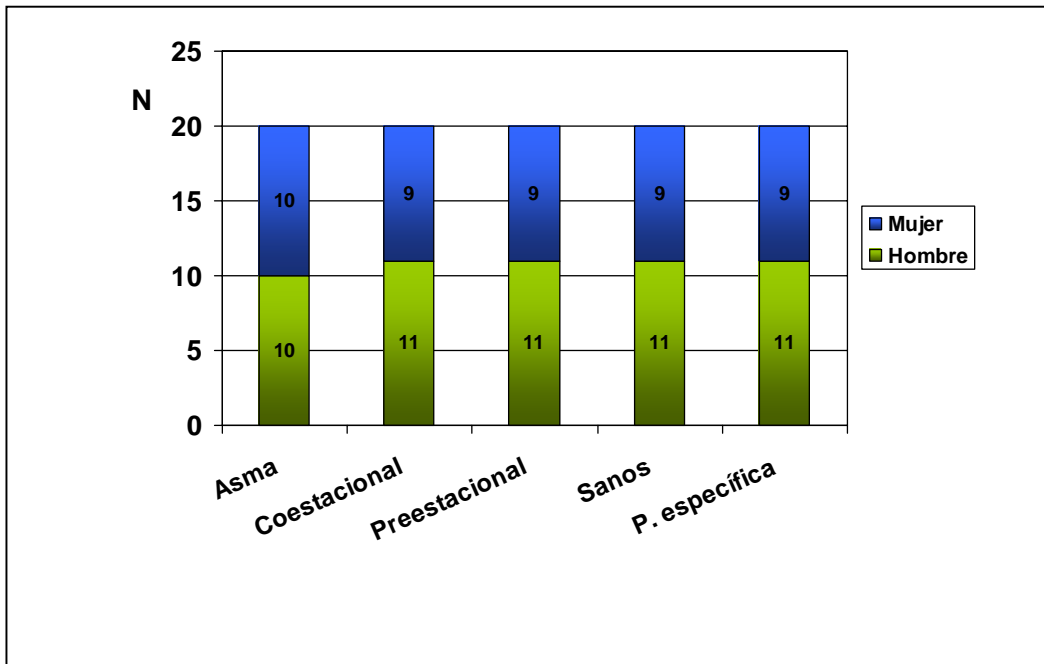


Figura 9. Sexo (1).

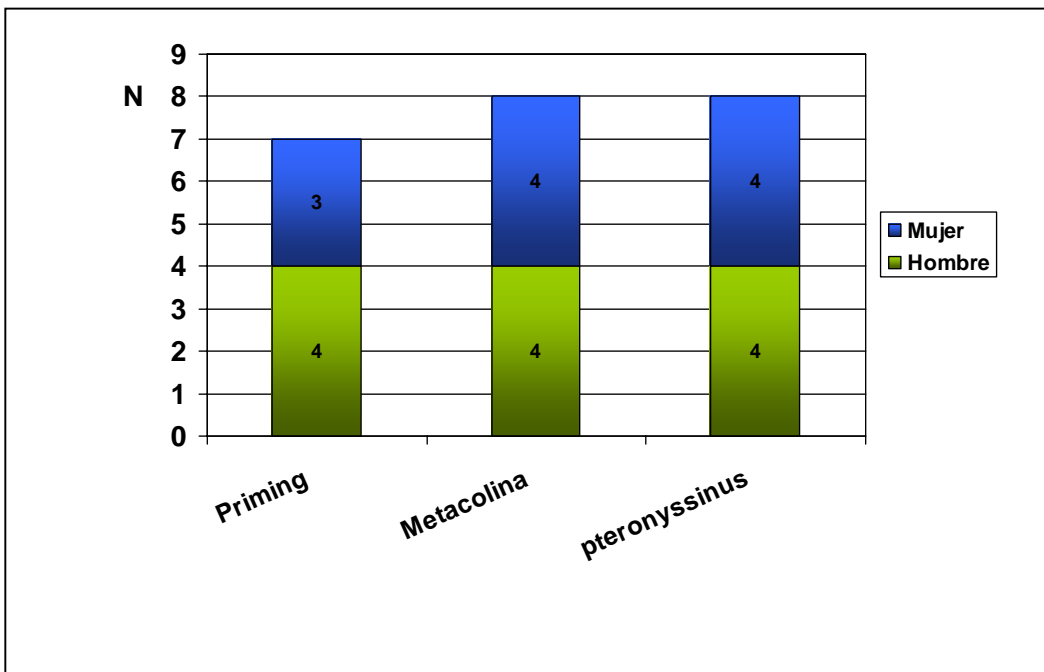


Figura 10. Sexo (2).

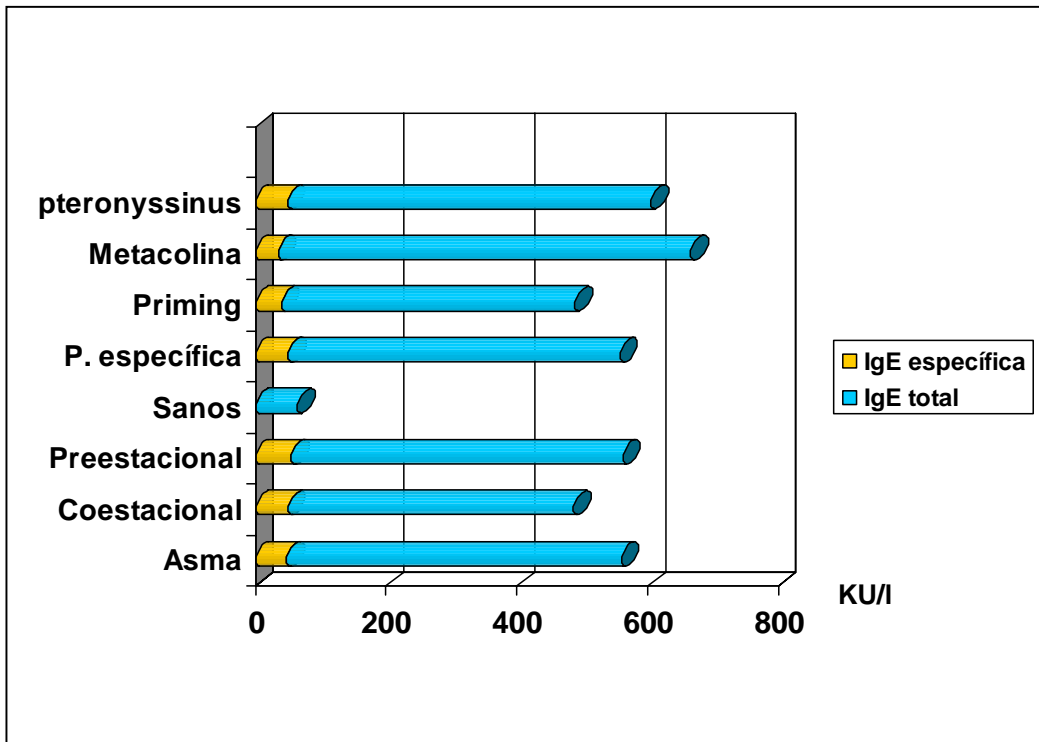


Figura 11. IgE total y específica.

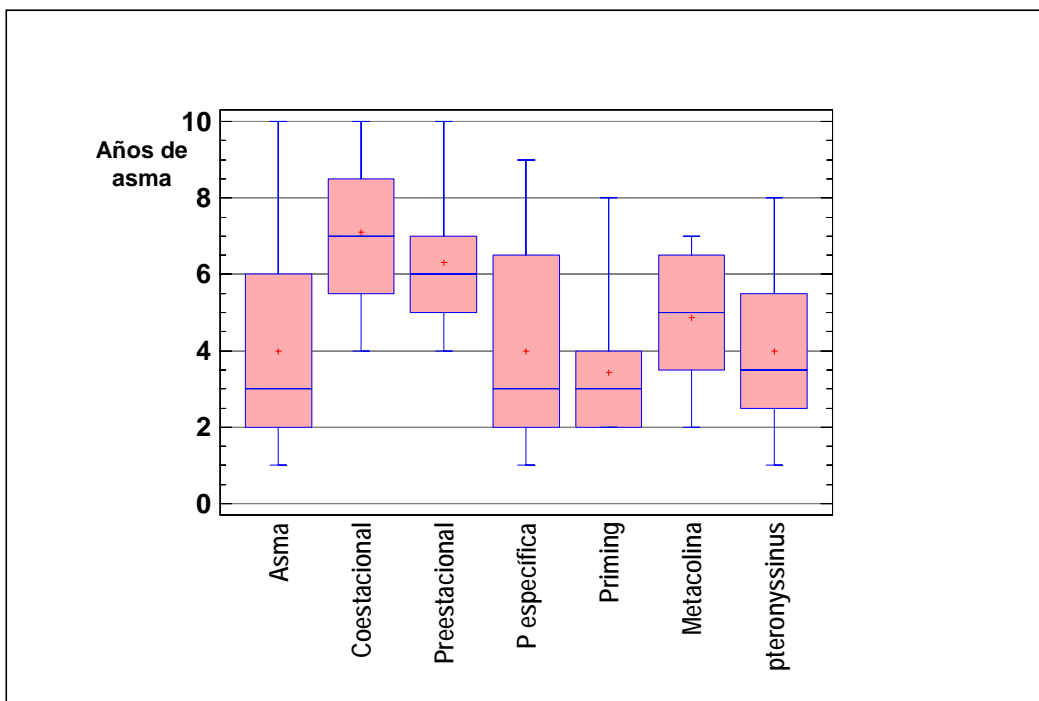


Figura 12. Años de evolución del asma.

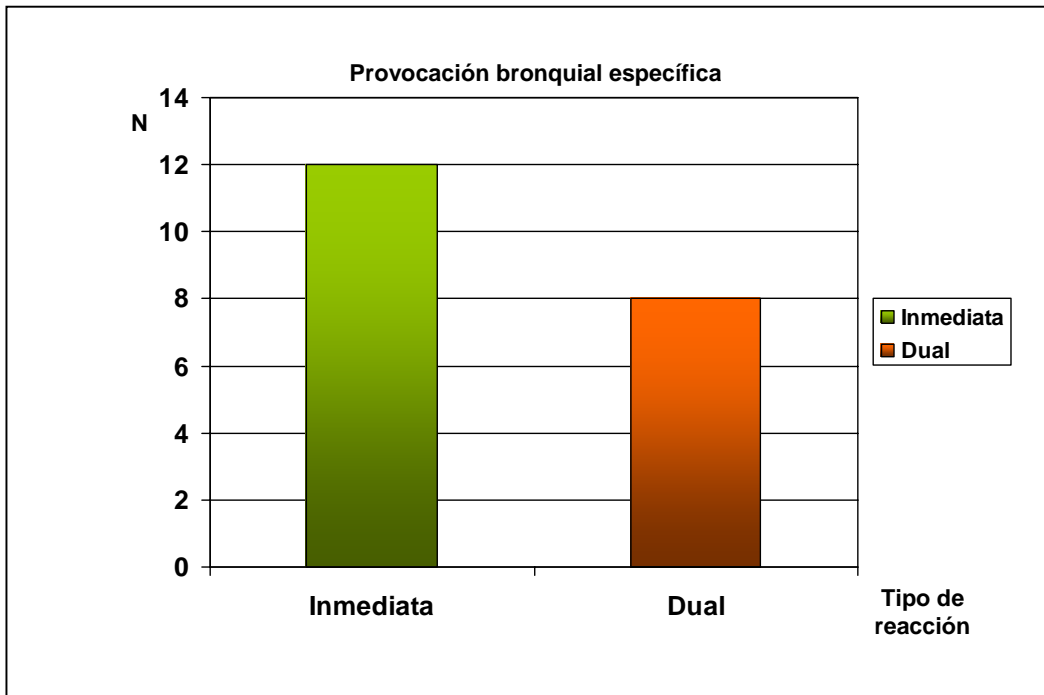


Figura 13. Tipo de respuesta en la provocación bronquial específica.

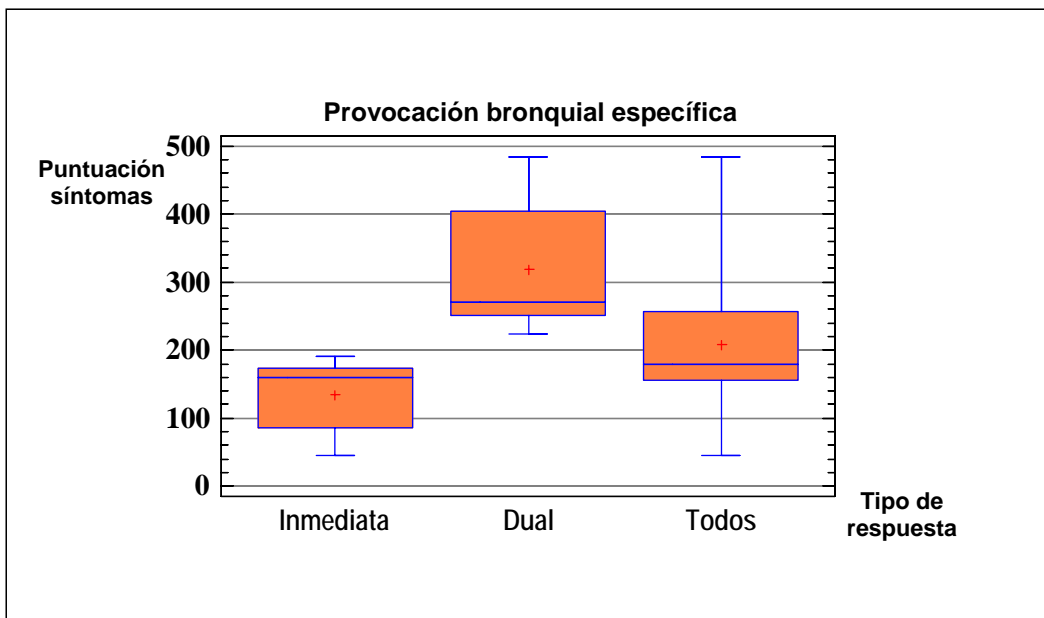


Figura 14. Puntuación de sintomatología en la provocación bronquial específica.

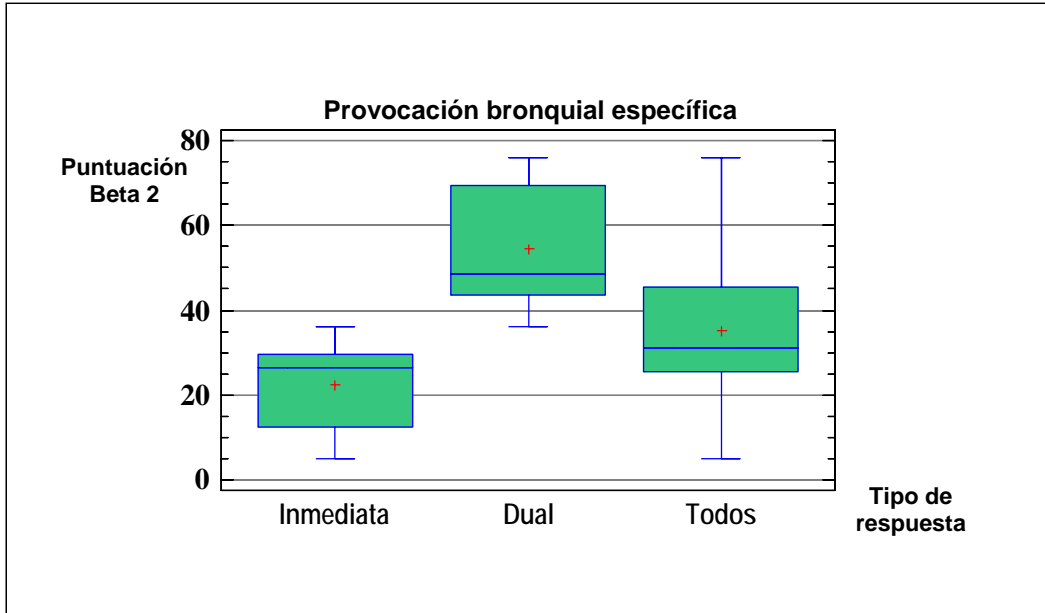


Figura 15. Puntuación de uso de medicación de rescate beta 2 en la provocación bronquial específica.

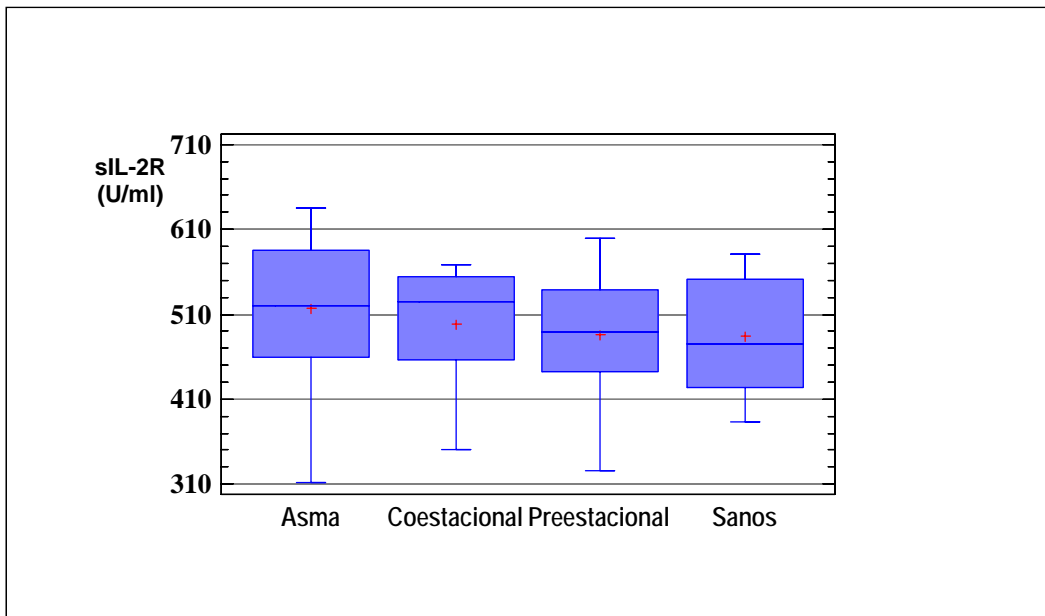


Figura 16. Niveles del sIL-2R antes de la primavera.

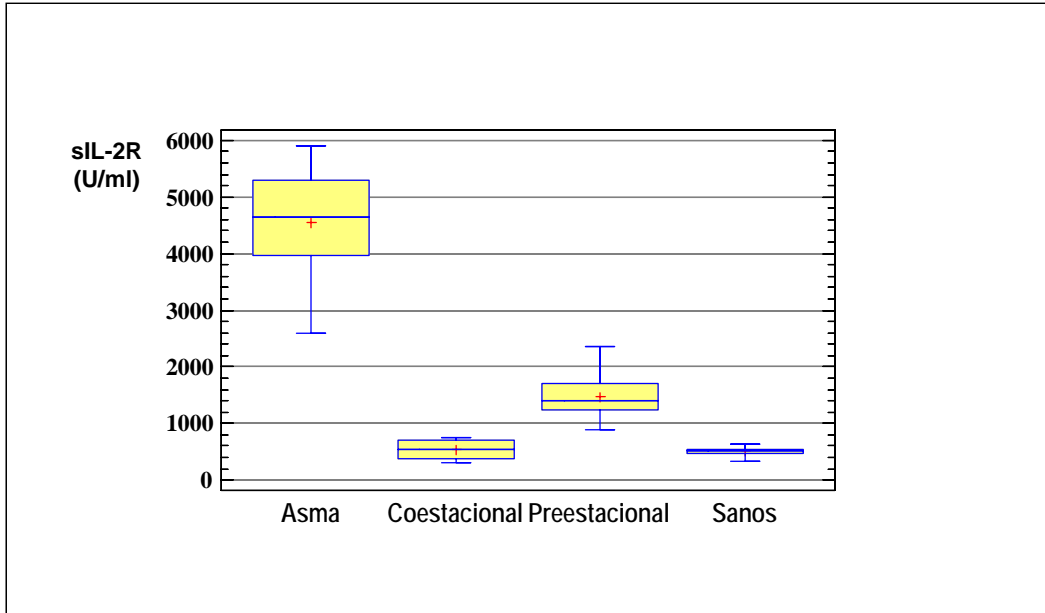


Figura 17. Niveles del sIL-2R durante la primavera.

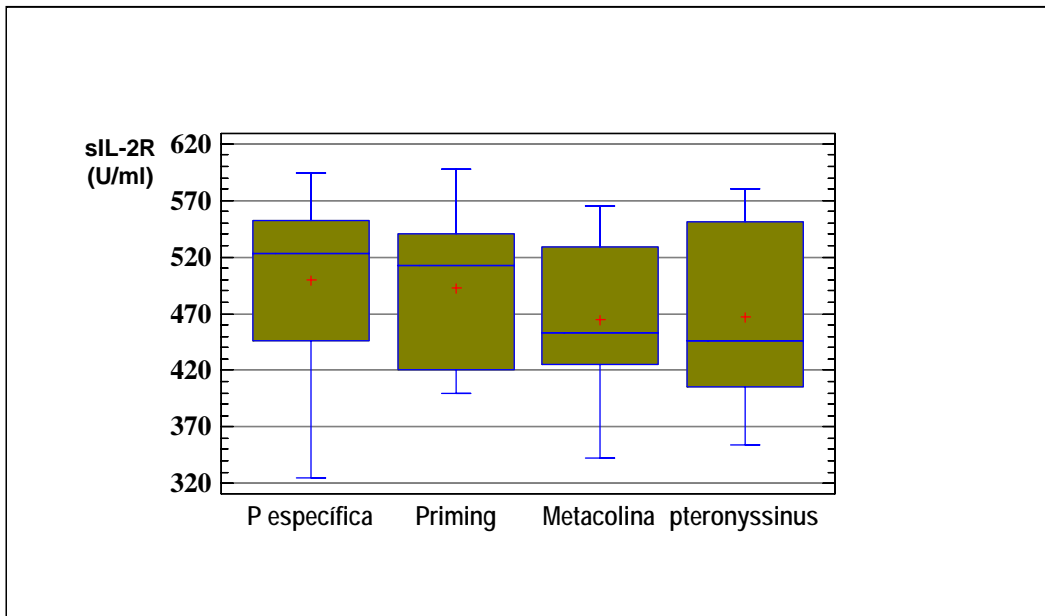


Figura 18. Niveles del sIL-2R antes de las provocaciones bronquiales.



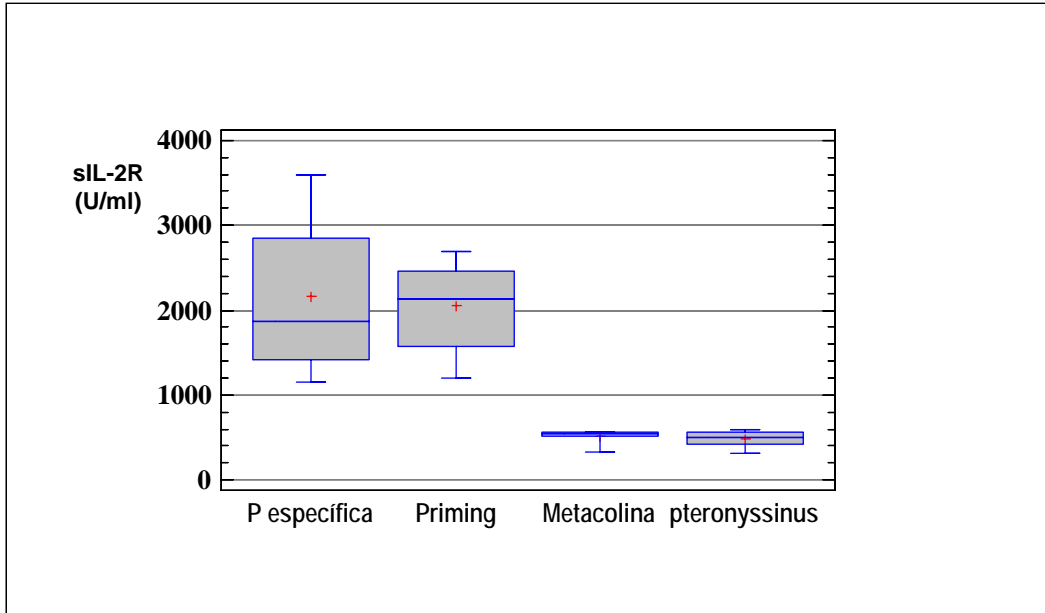


Figura 19. Niveles del sIL-2R después de las provocaciones bronquiales.

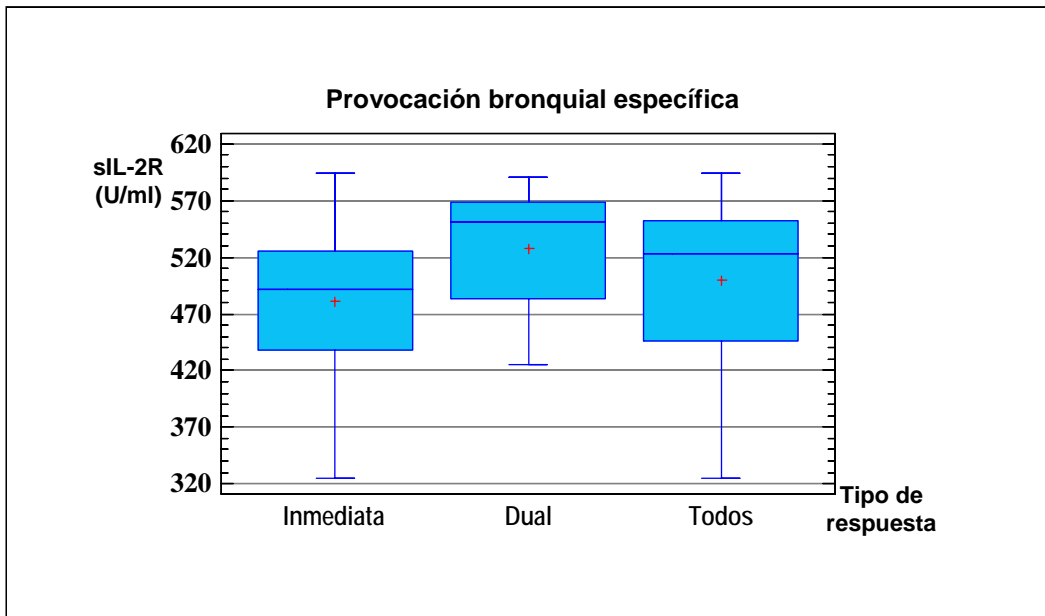


Figura 20. Niveles del sIL-2R antes de la provocación bronquial específica.

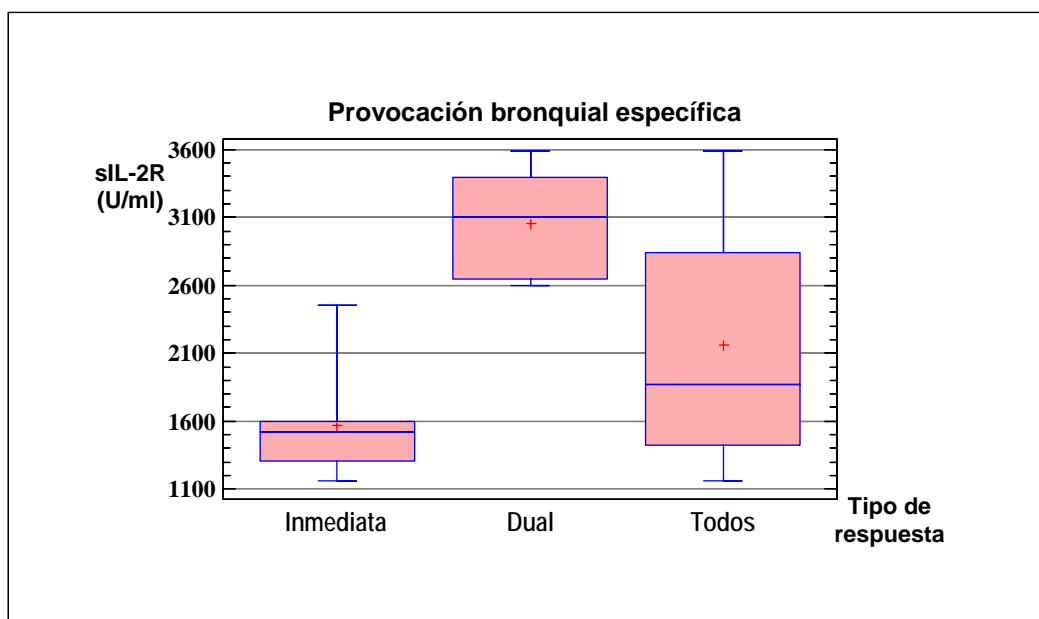


Figura 21. Niveles del sIL-2R después de la provocación bronquial específica.

## 4. ESTADÍSTICA ANALÍTICA

### 4.1. NIVELES DE sIL-2R ANTES Y DURANTE LA ESTACIÓN POLÍNICA

En los pacientes asmáticos no hiposensibilizados se produce un aumento significativo de los niveles de sIL-2R durante la primavera, estación polínica de las gramíneas, en la que están expuestos a niveles reactivos de pólenes atmosféricos ( $p: 0.000095$ ) (Figura 22). Sin embargo, en los sanos, no se produce este aumento de los niveles de sIL-2R durante la primavera ( $p 0.112$ ) (Figura 23).

Mientras que antes de la primavera los niveles de sIL-2R de los pacientes asmáticos son indistinguibles del de los sanos ( $p: 0.408$ ) (Figura 24), durante la primavera existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, con niveles significativamente superiores en el grupo de asmáticos ( $p < 0.05$ ) (Figura 25).

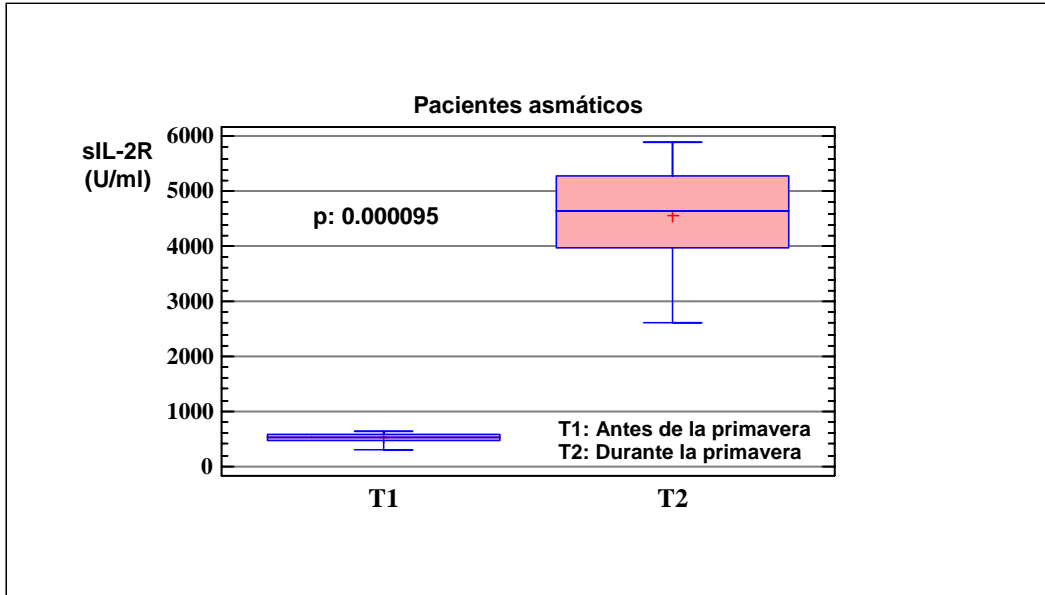


Figura 22. Niveles de sIL-2R antes y durante la primavera en pacientes asmáticos.

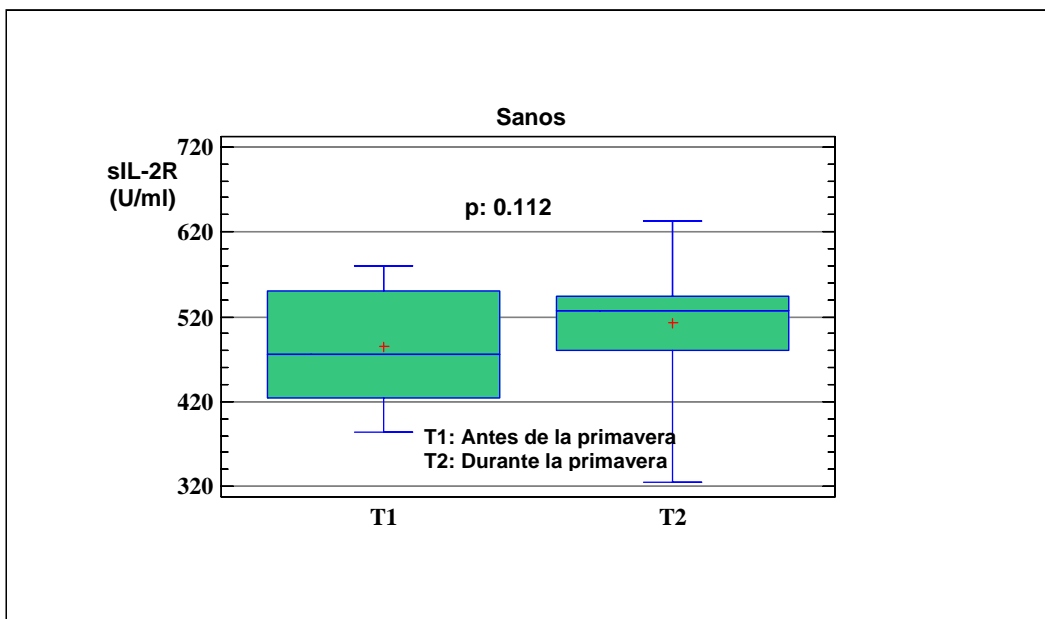


Figura 23. Niveles de sIL-2R antes y durante la primavera en controles sanos.

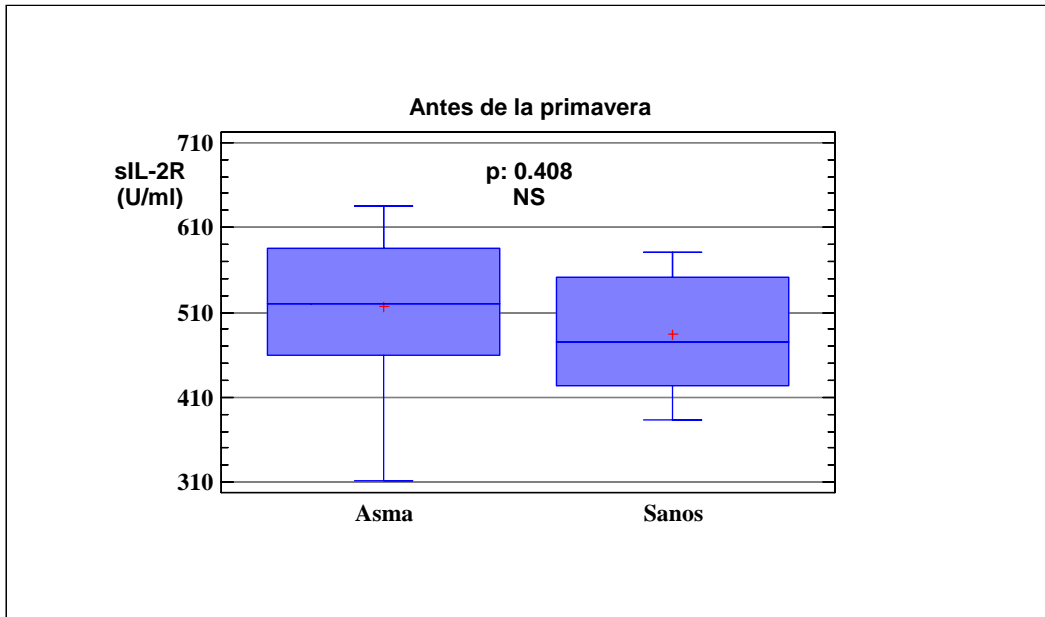


Figura 24. Niveles de sIL-2R antes de la primavera en pacientes asmáticos y controles sanos.

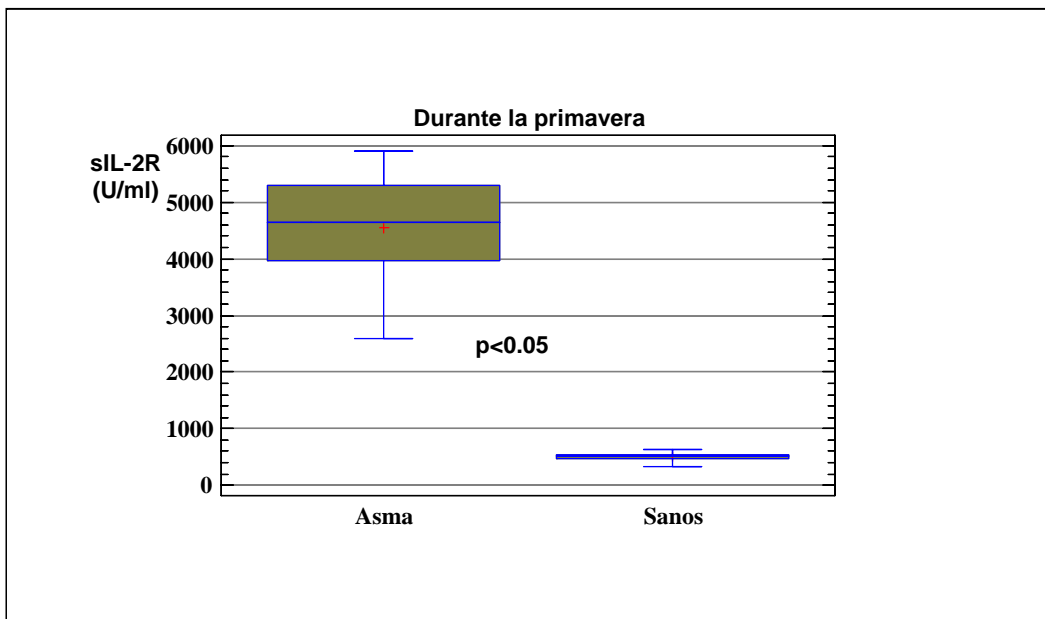


Figura 25. Niveles de sIL-2R durante la primavera en pacientes asmáticos y controles sanos.

En el grupo de asmáticos que ha recibido inmunoterapia coestacional no se produce un aumento significativo de los niveles de sIL-2R durante la estación polínica ( $p: 0.304$ ) (Figura 26), sin embargo, este aumento sí se produce en el grupo de pacientes asmáticos hiposensibilizados mediante inmunoterapia preestacional ( $p: 0.000095$ ) (Figura 27).

Antes de la primavera, los niveles de sIL-2R de los distintos grupos (asmáticos no hiposensibilizados, asmáticos hiposensibilizados con inmunoterapia preestacional o coestacional y sanos) no se diferencian entre sí ( $p: 0.408$ ) (Figura 28). Durante la estación polínica existe una diferencia estadísticamente significativa de los niveles de sIL-2R entre todos los grupos ( $p < 0.05$ ) excepto para el grupo de asmáticos tratados con inmunoterapia coestacional, cuyos niveles no se diferencian del de los controles sanos (Figuras 29 y 30).

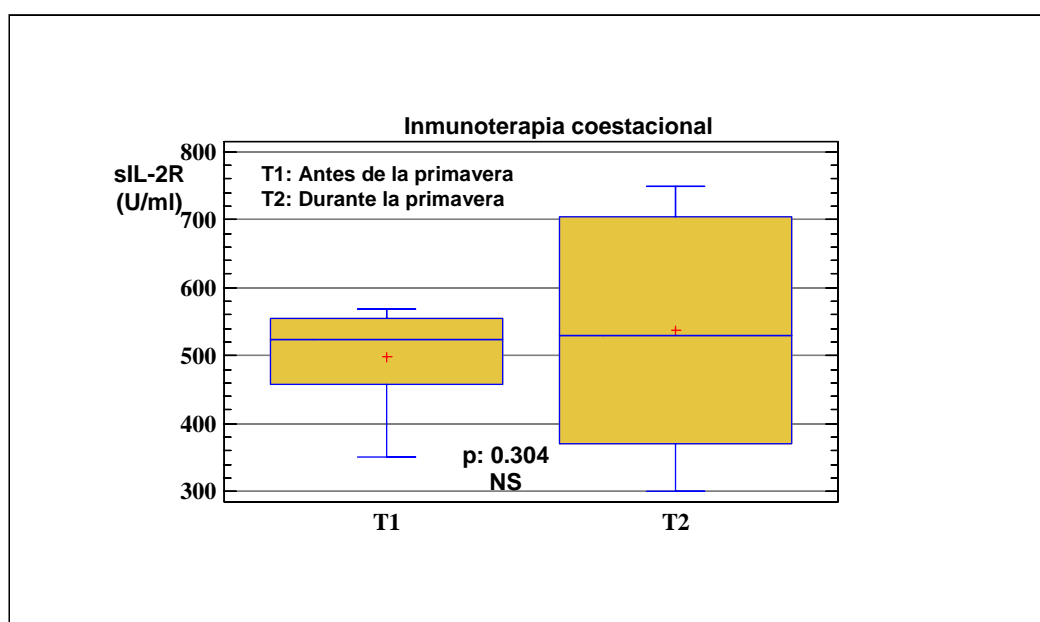


Figura 26. Niveles de sIL-2R antes y durante la primavera en pacientes asmáticos sometidos a inmunoterapia coestacional.

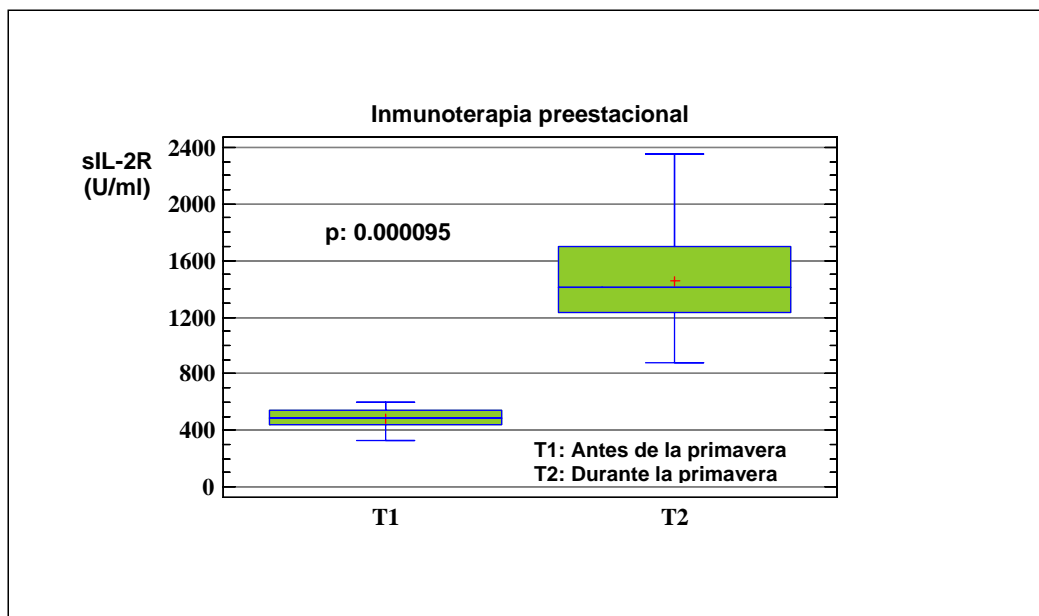


Figura 27. Niveles de sIL-2R antes y durante la primavera en pacientes asmáticos sometidos a inmunoterapia preestacional.

Con respecto a los pacientes inmunizados, mientras que la inmunoterapia coestacional evitaría el aumento significativo de los niveles de sIL-2R durante la estación polínica (que se produce en los asmáticos no inmunizados) siendo sus niveles indistinguibles del de los sanos, la inmunoterapia preestacional no evitaría este aumento. En los pacientes tratados con inmunoterapia preestacional, si bien existe un descenso del aumento de los niveles de sIL-2R durante la estación polínica respecto a los pacientes asmáticos no inmunizados (existiendo diferencias significativas entre ambos grupos con niveles superiores en el grupo no inmunizado), este no es suficiente como para que no haya diferencias con el grupo de controles sanos o asmáticos tratados con inmunoterapia coestacional. La Figura 31 resume los niveles de sIL-2R en todos los grupos.

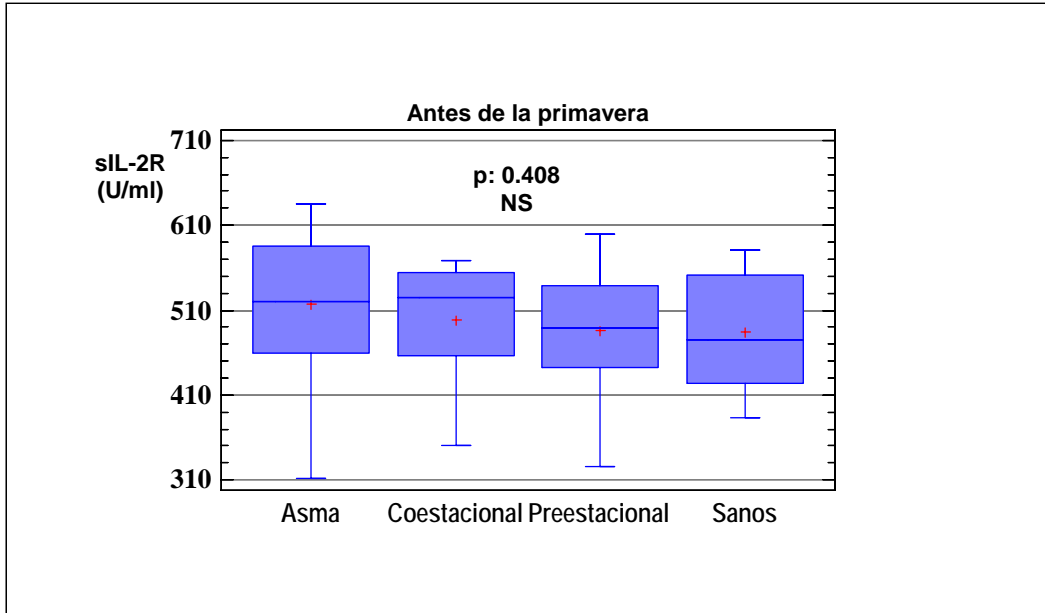


Figura 28. Niveles de sIL-2R antes de la primavera en todos los grupos.

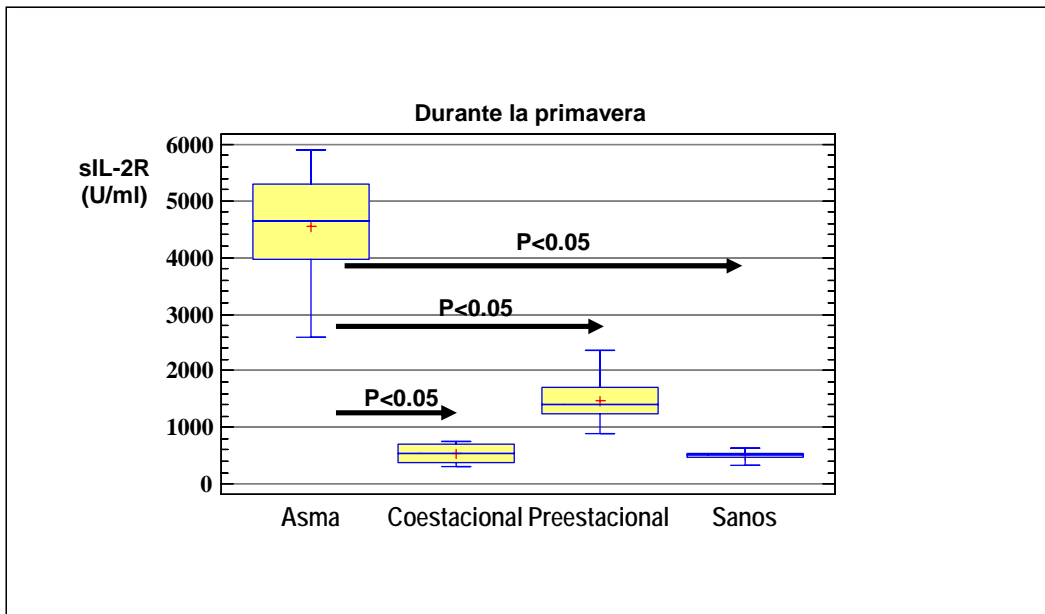


Figura 29. Niveles de sIL-2R durante la primavera en todos los grupos (1).

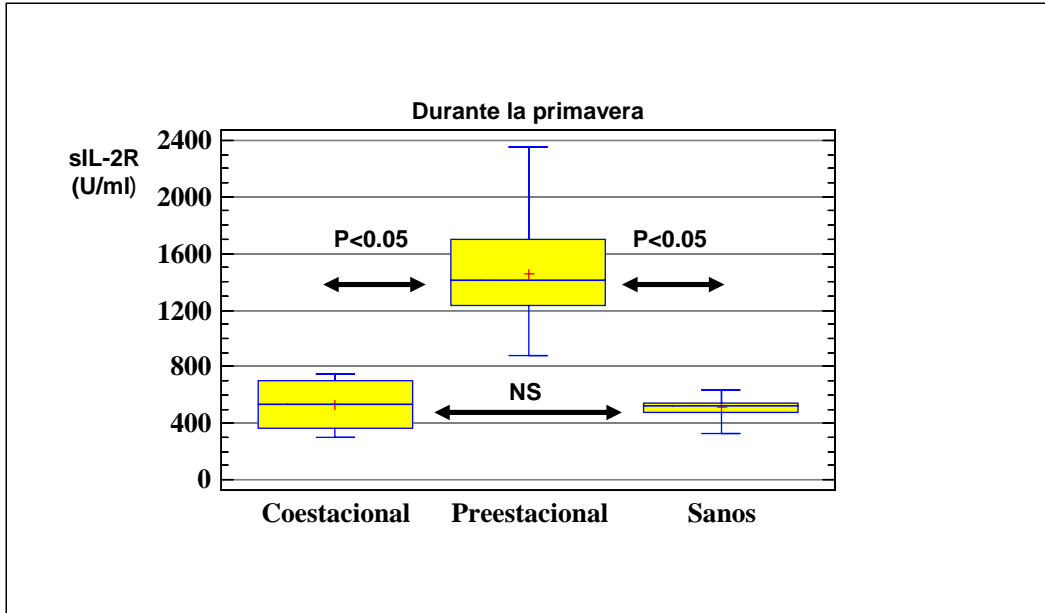


Figura 30. Niveles de sIL-2R durante la primavera en todos los grupos (2).

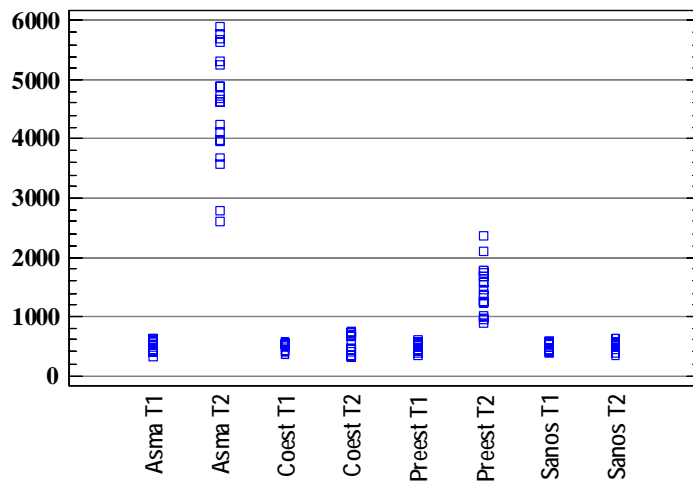


Figura 31. Niveles de sIL-2R antes y durante la primavera en todos los grupos.



## 4.2. NIVELES DE sIL-2R Y PROVOCACIÓN BRONQUIAL

La realización de una provocación bronquial específica en pacientes asmáticos no hiposensibilizados produjo un aumento significativo de los niveles de sIL-2R ( $p: 0.000095$ ) (Figura 32).

Cuando se realizó una provocación bronquial específica tipo priming en asmáticos no hiposensibilizados, también se produjo un aumento significativo de los niveles de sIL-2R ( $p: 0.022$ ) (Figura 33).

Por el contrario, la realización de una provocación bronquial con un antígeno al cual no eran sensibles (*D. Pteronyssinus*), o de una provocación bronquial inespecífica con metacolina, no produjo un aumento significativo de los niveles de sIL-2R ( $p: 1$  y  $0.14$  respectivamente) (Figuras 34 y 35).

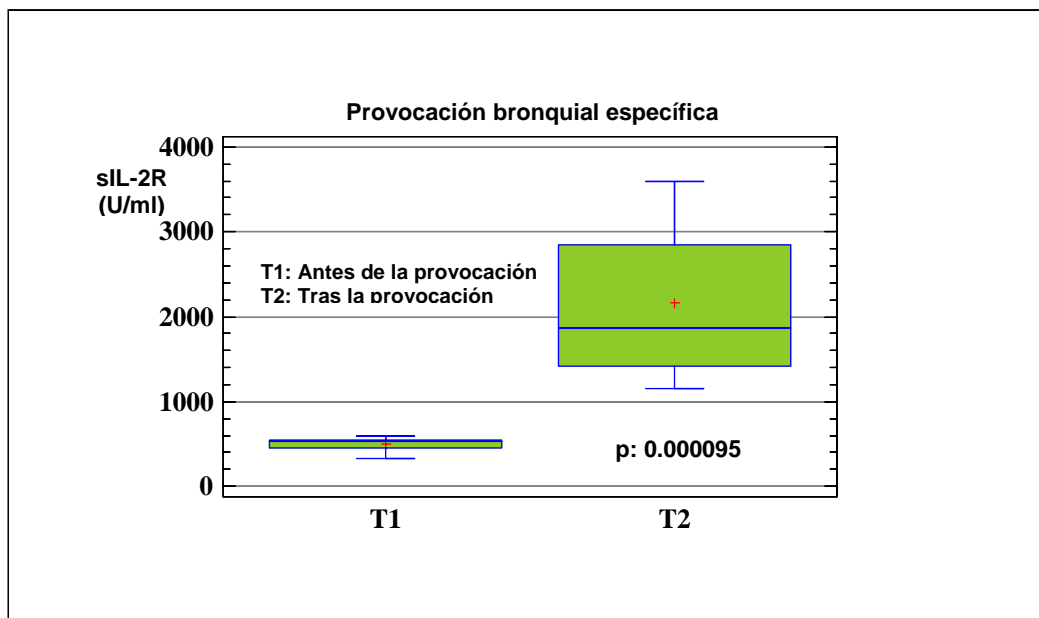


Figura 32. Modificación de los niveles de sIL-2R en la provocación bronquial específica.

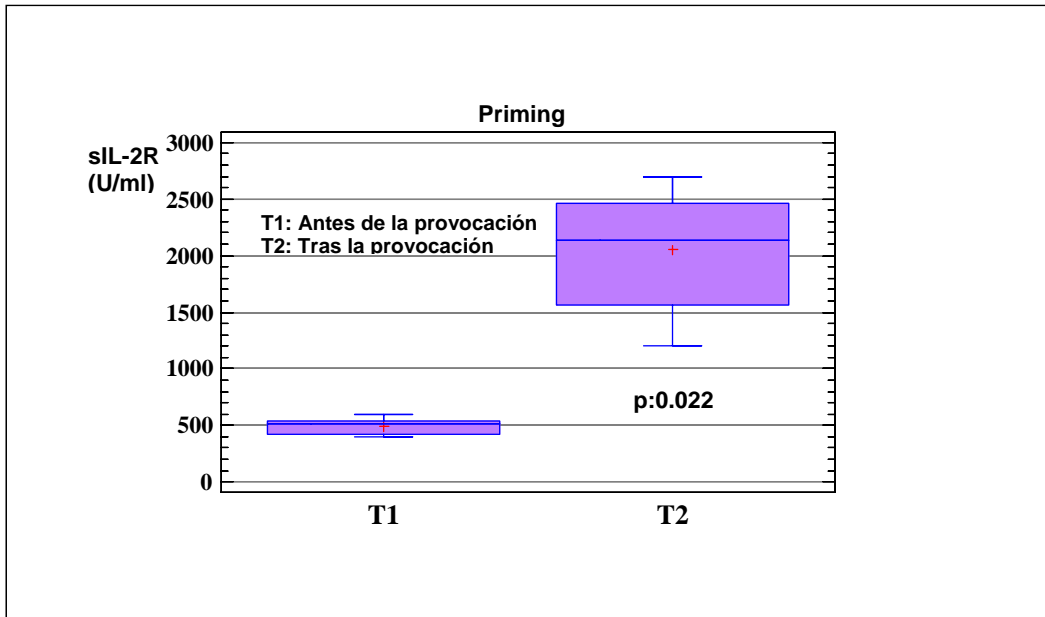


Figura 33. Modificación de los niveles de sIL-2R en la provocación tipo priming.

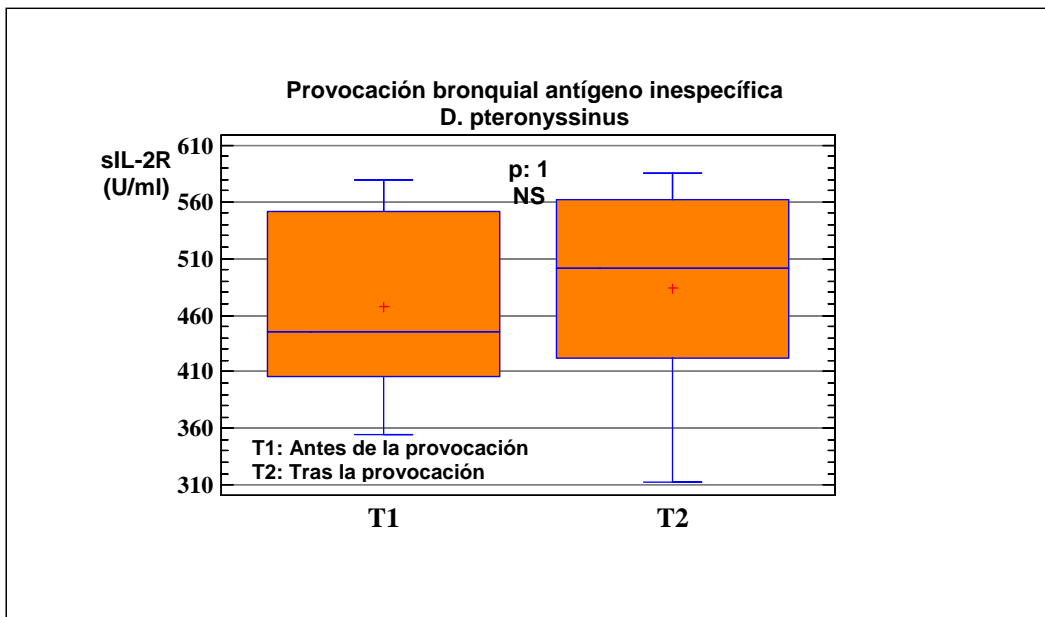


Figura 34. Modificación de los niveles de sIL-2R en la provocación bronquial antígeno inespecífica (D. Pteronyssinus).

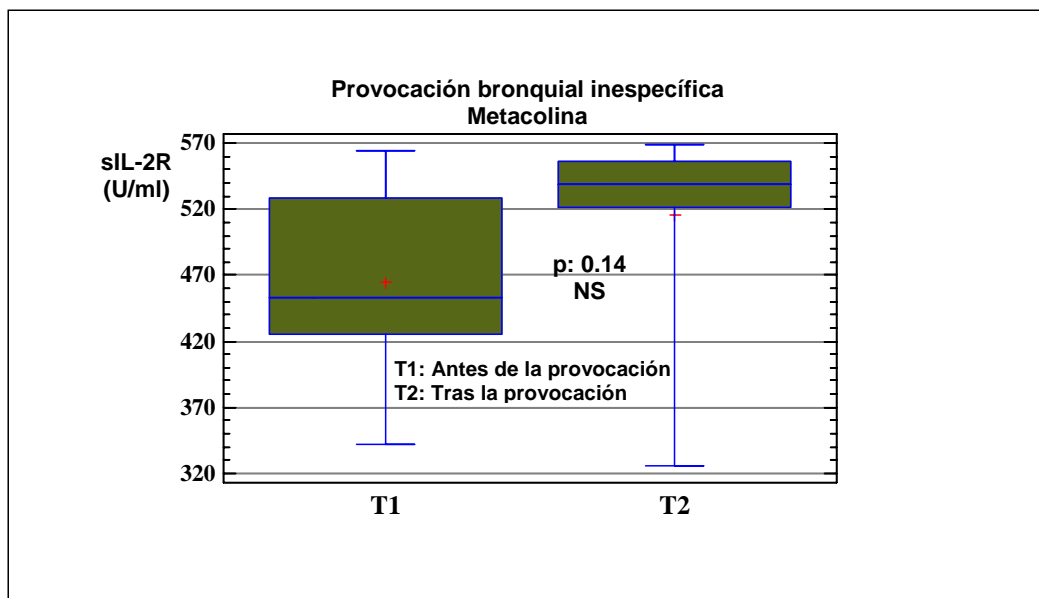


Figura 35. Modificación de los niveles de sIL-2R en la provocación bronquial inespecífica con metacolina.

#### 4.3. DIFERENCIAS ENTRE RESPUESTA INMEDIATA Y DUAL EN LA PROVOCACIÓN BRONQUIAL ESPECÍFICA

Los paciente sometidos a provocación bronquial específica fueron divididos en dos subgrupos (pacientes que presentaron respuesta inmediata y pacientes que presentaron respuesta dual) con objeto de evaluar las posibles diferencias entre ambos subgrupos.

Tanto los pacientes que en la provocación bronquial específica presentaron una respuesta inmediata como aquellos que presentaron una respuesta dual, presentaron un aumento significativo de los niveles de sIL-2R tras la provocación (p: 0.0025 para la respuesta inmediata y p: 0.014 para la respuesta dual) (Figuras 36 y 37).

Antes de la provocación no existían diferencias significativas de los niveles de sIL-2R entre los dos grupos ( $p: 0.096$ ) (Figura 38). Tras la provocación, los niveles eran mayores en los que presentaron respuesta dual ( $p: 0.00024$ ) (Figura 39).

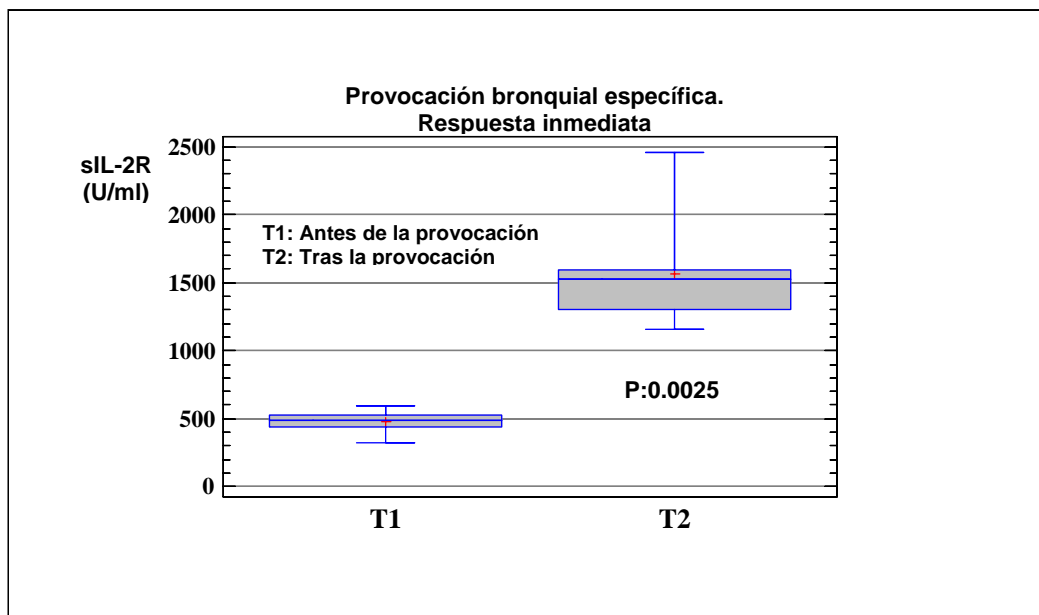


Figura 36. Modificaciones de los niveles de sIL-2R en la provocación bronquial específica con respuesta. Inmediata.

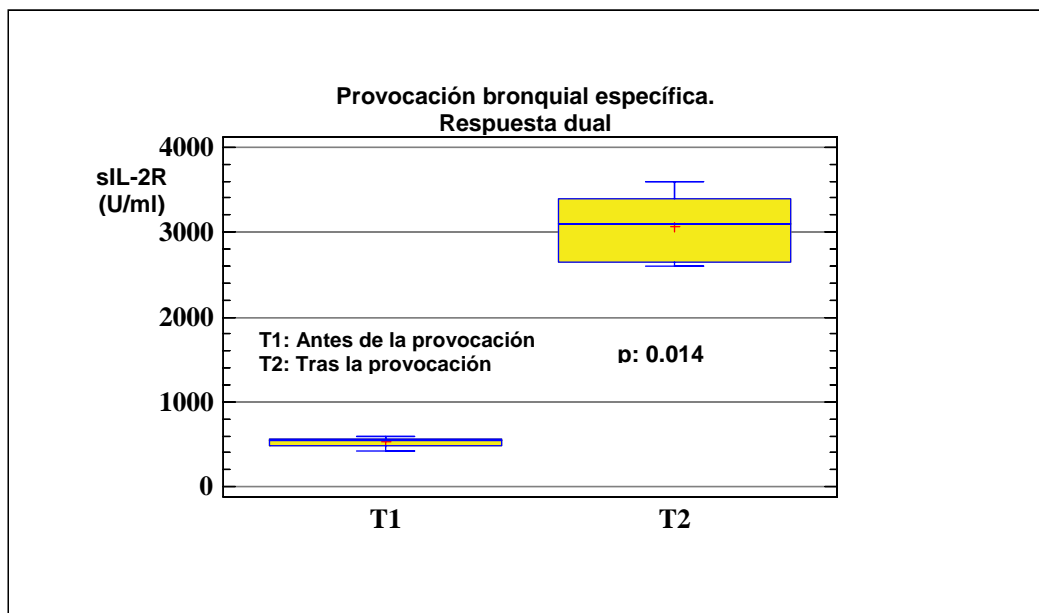


Figura 37. Modificaciones de los niveles de sIL-2R en la provocación bronquial específica con respuesta dual.

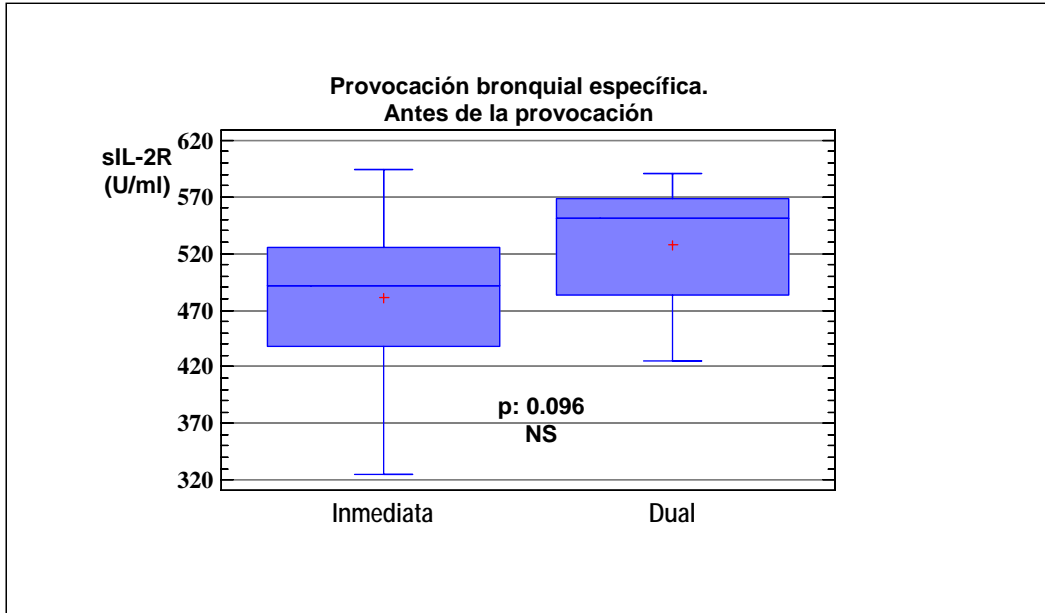


Figura 38. Comparación de los niveles de sIL-2R en la provocación bronquial específica, antes de la provocación, según el tipo de respuesta.

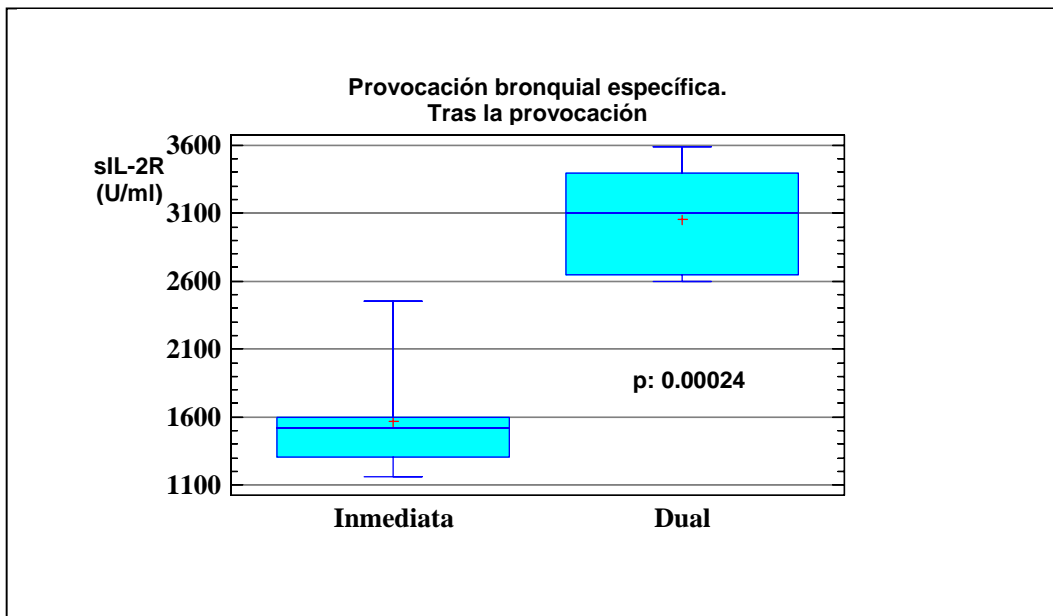


Figura 39. Comparación de los niveles de sIL-2R en la provocación bronquial específica, después de la provocación, según el tipo de respuesta.

Los pacientes que presentaron una respuesta dual tenían más síntomas ( $p: 0.00024$ ) durante la estación polínica y precisaban más medicación beta 2 de rescate ( $p: 0.00028$ ) que los que presentaron una respuesta inmediata (Figuras 40 y 41).

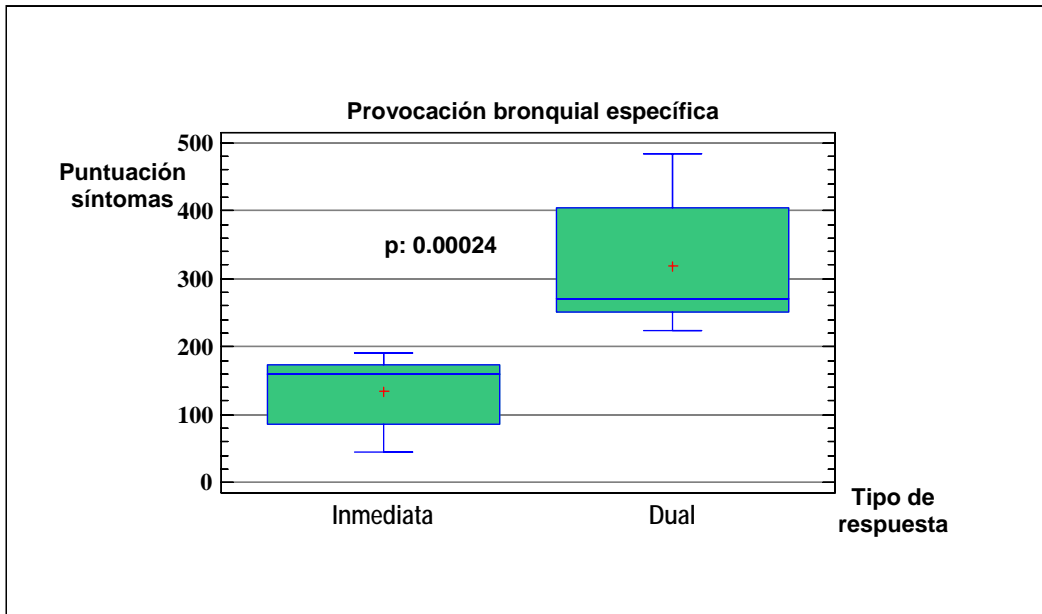


Figura 40. Comparación de las puntuaciones de síntomas según el tipo de respuesta en la provocación bronquial específica.

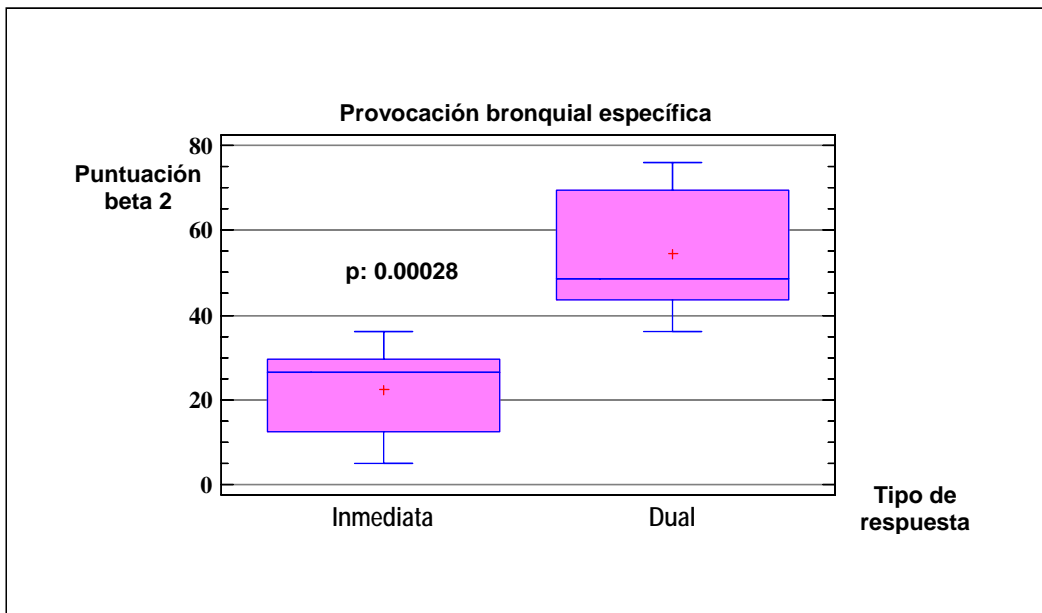


Figura 41. Comparación de las puntuaciones de uso de mediación beta 2 de rescate según el tipo de respuesta en la provocación bronquial específica.

En el grupo que presentó una respuesta inmediata existía una correlación significativa entre la puntuación de síntomas y el uso de mediación beta 2 inhalada de rescate ( $r: 0.84$ ,  $p:0.0052$ ), sin embargo no se encontró una correlación significativa entre la puntuación de uso de medicación beta 2 de rescate inhalada y los niveles de sIL-2R posprovocación ( $r: 0.30$ ,  $p: 0.31$ ) ni entre la puntuación de síntomas y los niveles de sIL-2R tras la provocación ( $r: 0.18$ ,  $p: 0.54$ ) (Figuras 42, 43 y 44).

En el grupo que presentó una respuesta dual existía una correlación significativa entre la puntuación de síntomas y el uso de mediación beta 2 inhalada de rescate ( $r: 0.95$ ,  $p:0.011$ ), entre la puntuación de uso de medicación beta 2 de rescate inhalada y los niveles de sIL-2R posprovocación ( $r: 0.80$ ,  $p: 0.033$ ) y entre la puntuación de síntomas y los niveles de sIL-2R tras la provocación ( $r: 0.89$ ,  $p: 0.017$ ) (Figuras 45, 46 y 47).

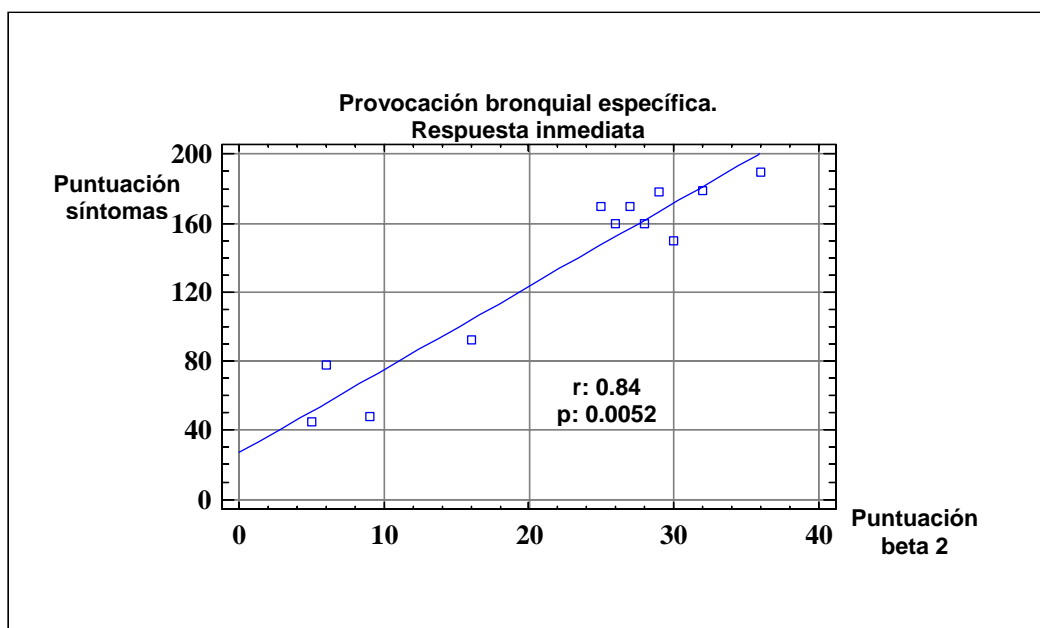


Figura 42. Correlación entre la sintomatología y el uso de mediación beta 2 de rescate en los pacientes con respuesta inmediata en la provocación bronquial específica.

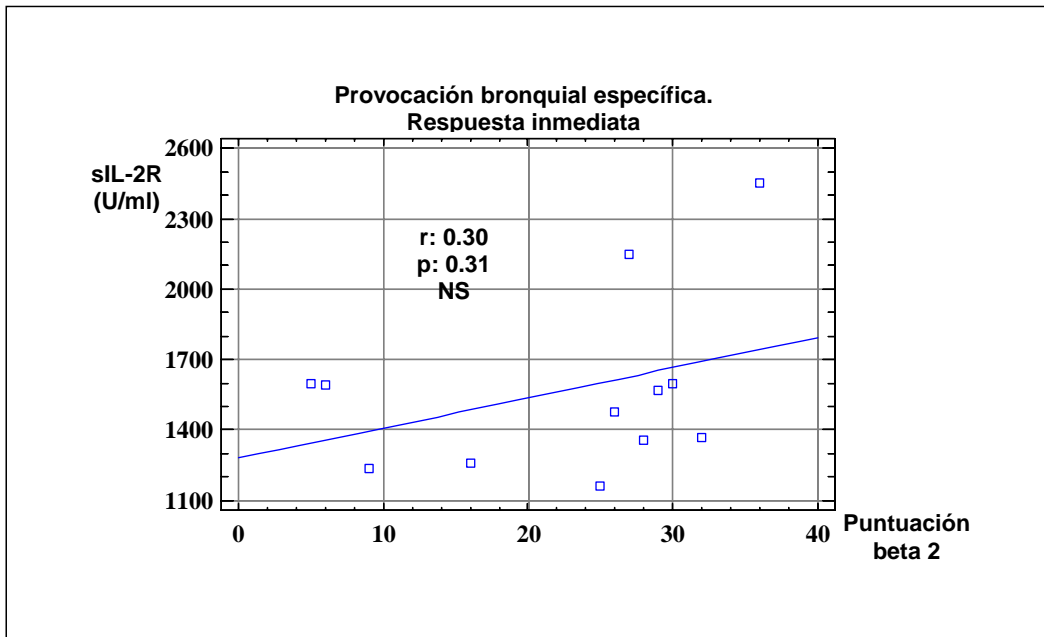


Figura 43. Correlación entre el aumento de los niveles de sIL-2R y el uso de mediación beta 2 de rescate en los pacientes con respuesta inmediata en la provocación bronquial específica.

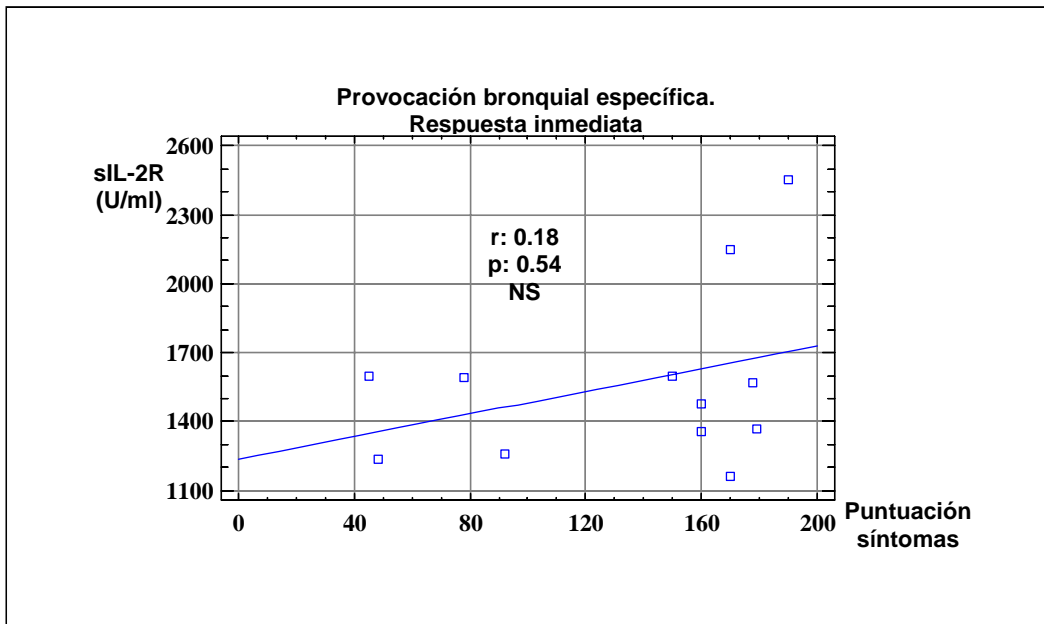


Figura 44. Correlación entre la sintomatología y el aumento de los niveles de sIL-2R en los pacientes con respuesta inmediata en la provocación bronquial específica.



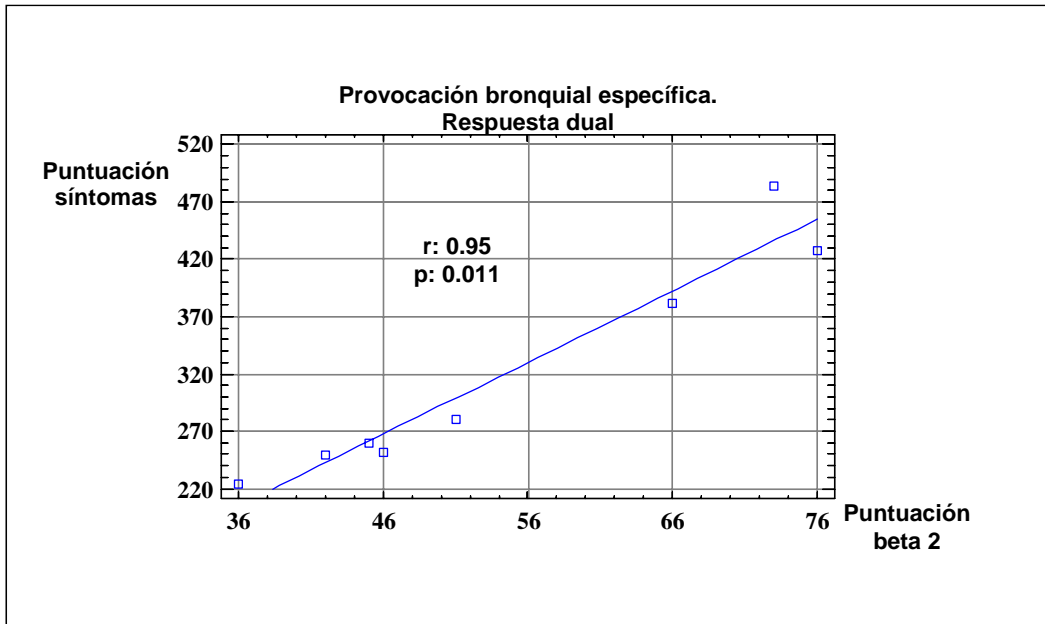


Figura 45. Correlación entre la sintomatología y el uso de mediación beta 2 de rescate en los pacientes con respuesta dual en la provocación bronquial específica.

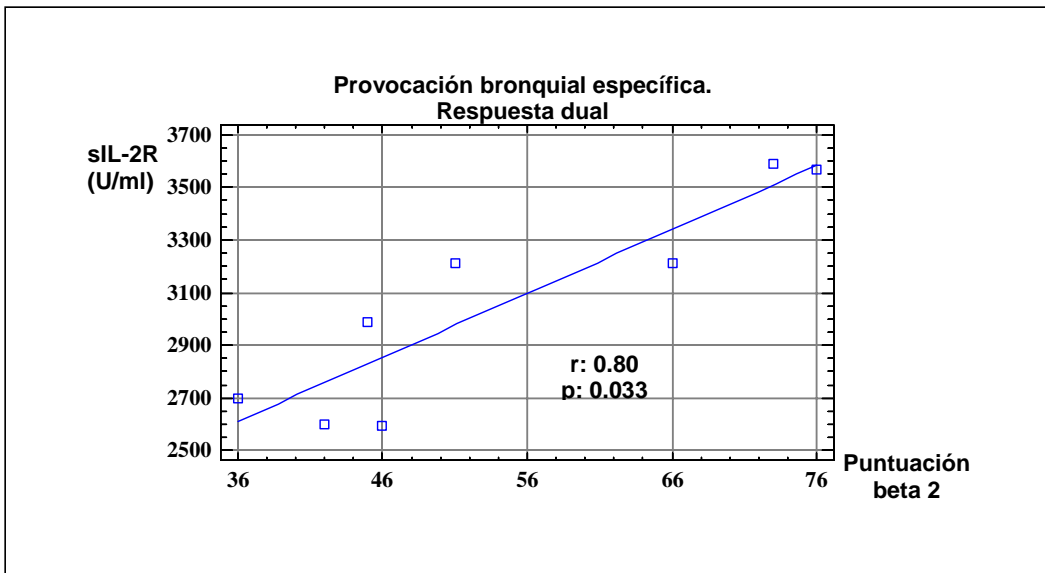


Figura 46. Correlación entre el aumento de los niveles de sIL-2R y el uso de mediación beta 2 de rescate en los pacientes con respuesta dual en la provocación bronquial específica.

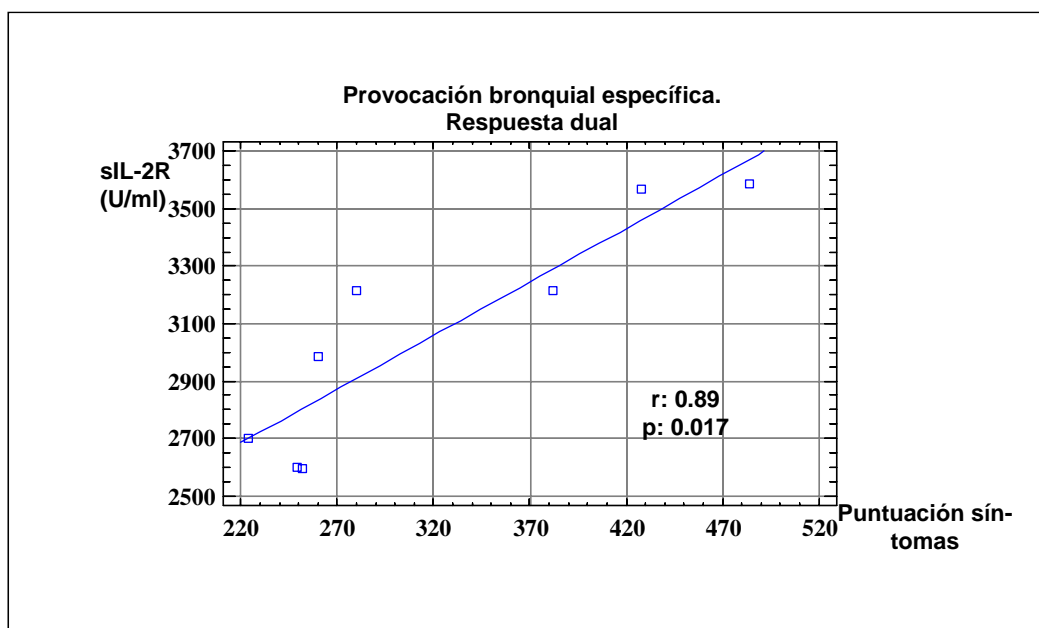


Figura 47. Correlación entre la sintomatología y el aumento de los niveles de sIL-2R en los pacientes con respuesta dual en la provocación bronquial específica.

## **VII. DISCUSIÓN**



Para la realización de la discusión, analizaremos los resultados obtenidos en nuestro trabajo así como los diversos estudios publicados sobre el tema. Desde que Rubin describiera por primera vez el sIL-2R en 1985, diversos trabajos se han centrado en la determinación de este factor soluble en el asma bronquial, existiendo en la literatura médica varias decenas de artículos que de manera directa o indirecta, centran su atención en este factor. Como premisa diremos que nuestro trabajo plantea la determinación de los niveles de sIL-2R *in vitro*, en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, mientras que ninguno de los trabajos realizados hasta la fecha, salvo el estudio de Hsieh<sup>218</sup>, que comentaremos posteriormente, se plantea en estos términos, lo cual hay que tenerlo en consideración a la hora de realizar comparaciones entre nuestro estudio y los demás.

¿Por qué tras estimulación con PHA? 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 controlada y uniforme que permita extraer conclusiones más firmes. Entre esas sustancias se encuentra la PHA. La PHA es una lectina multivalente, proteína de origen vegetal derivada de la planta *Phaseolus vulgaris*, capaz de producir aglutinación con eritrocitos humanos. Está ampliamente demostrado que es capaz de inducir la activación de las células T<sup>240</sup>. 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<sup>241-243</sup>. 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.

## **1. Niveles de sIL-2R en el asma bronquial. ¿Existen diferencias entre una población normal sana de referencia y los enfermos asmáticos?**

Son numerosos los trabajos que determinan los niveles de sIL-2R en pacientes asmáticos, siendo estos comparados con los de controles sanos. En otras ocasiones se comparan los niveles entre pacientes asmáticos de distinta gravedad (asmáticos estables y pacientes con ataque agudo de asma).

Hoy día, el papel fundamental del linfocito T en el asma bronquial como célula organizadora de la red celular implicada en el asma ha sido ampliamente demostrado en numerosos trabajos. Walter demuestra, mediante análisis de citometría de flujo de marcadores de activación celular T, que los individuos asmáticos se caracterizan por un aumento significativo del número de IL-2R en las células T (en comparación con un grupo control sano), lo que expresa el grado de activación de estas células en el asma. También observa que el número absoluto de células T IL-2R+ se correlaciona con la eosinofilia observada en los pacientes asmáticos, demostrando la relación existente entre linfocitos T y los eosinófilos en los pacientes asmáticos<sup>244</sup>.

Un estudio midió las subpoblaciones celulares T CD4 y CD8 IL-2R + y celulares B IL-2R + en linfocitos de sangre periférica de niños con ataques severos agudos de asma, estando estas significativamente más elevadas que antes del ataque<sup>245</sup>.

El aumento de la densidad del CD25 en la superficie de los linfocitos T activados, origina una elevación de la fracción soluble, como demuestran los siguientes trabajos.

Park midió la concentración de sIL-2R, la composición celular y la expresión de IL-2R en linfocitos T del fluido de lavado broncoalveolar de pacientes con asma sintomático, pacientes con asma asintomático y controles sanos. La concentración de sIL-2R y el radio de expresión de IL-2R en los linfocitos CD3 estaban significativamente más elevados en los

asmáticos sintomáticos que en los asintomáticos o controles, sin haber diferencias entre los dos últimos grupos. La concentración de sIL-2R se correlacionó con el porcentaje de expresión de IL-2R en los linfocitos T<sup>246</sup>.

En el trabajo de Shi se midieron los niveles de sIL-2R sérica y las subpoblaciones de linfocitos T de niños con ataques de asma, usando como controles a niños sanos y niños con asma estable. Por microscopía inmunoelectrónica se demostró una aumentada expresión de IL-2R en los linfocitos T en ataques agudos de asma respecto a los controles. Asimismo, los niveles de sIL-2R y el porcentaje de linfocitos T de sangre periférica estaban significativamente más elevados en los niños con ataque agudo de asma que en los controles<sup>247</sup>, lo que demuestra que los linfocitos T se activan en el ataque de asma, expresando IL-2R en su superficie y liberando sIL-2R.

Otros trabajos determinaron los niveles séricos del sIL-2R y la expresión del IL-2R en los linfocitos T de sangre periférica de pacientes con asma agudo severo y controles, habiendo un significativo mayor número de linfocitos T CD4 que expresan IL-2R y mayores niveles de sIL-2R en los pacientes asmáticos agudos que en los controles. Las concentraciones del sIL-2R descendieron cuando los pacientes mejoraron clínicamente, encontrándose una correlación significativa entre la mejoría de la obstrucción de la vía aérea (medida mediante el PEF) y el descenso de la concentración del sIL-2R sérico, así como entre la mejoría de la obstrucción de la vía aérea y el descenso del porcentaje de linfocitos T IL-2R+ de sangre periférica<sup>248-249</sup>.

De esta forma, los trabajos referidos evidencian un aumento de los niveles de sIL-2R en los pacientes asmáticos y estos niveles, a su vez, son relacionados con el aumento de la expresión de IL-2R en la superficie de los linfocitos T, lo cual indica una mayor actividad de esta célula en el asma.

Como nos referimos con anterioridad, la activación del linfocito T se inicia con el estímulo de la célula por la IL-2. Park relaciona los niveles de IL-2 y sIL-2R. Se midieron las

concentraciones de IL-2, sIL-2R y la composición celular en el fluido de lavado broncoalveolar de pacientes con asma. La concentración de IL-2 y sIL-2R fue mayor en el lavado broncoalveolar de pacientes sintomáticos que pacientes asintomáticos o sanos. Existía una correlación entre IL-2 y sIL-2R en los pacientes asmáticos. La concentración de IL-2 estaba inversamente relacionada con el FEV<sub>1</sub> en asmáticos sintomáticos<sup>250</sup>.

Existen numerosos estudios que determinan los niveles del sIL-2R, siendo realizadas la mayoría de determinaciones en suero.

De esta forma, los trabajos de Wang<sup>251</sup> y de Shiota<sup>252</sup> demuestran que los niveles séricos de sIL-2R están significativamente más elevados en los pacientes asmáticos que en los sujetos sanos.

Matsumoto et al midieron los niveles séricos de sIL-2R en 77 adultos asmáticos leve-moderado y 75 controles sanos, encontrando también que los niveles de sIL-2R estaban significativamente más elevados en los asmáticos que en los controles<sup>253</sup>.

En el estudio de Hashimoto se midieron los niveles séricos de sIL-2R en un grupo de 25 pacientes con asma alérgica y otro grupo control de 25 sanos. Los niveles séricos de sIL-2R eran significativamente mayores en el grupo asmático. Existía una significativa correlación entre los niveles séricos de sIL-2R e IL-4. También encontraron que los pacientes con niveles simultáneamente elevados de sIL-2R e IL-4, presentaban niveles séricos bajos de INF- $\gamma$ , lo que apoya la hipótesis de una activación in vivo predominante de linfocitos T helper 2 en sangre periférica en asmáticos alérgicos<sup>254</sup>.

Motojima et al midieron la concentración sérica de sIL-2R en pacientes con asma (bien asma en remisión o bien ataque agudo de asma) y controles sanos, siendo significativamente más elevada en los pacientes asmáticos, independientemente del grado de asma (ataque agudo o asma en remisión). Por otra parte, los pacientes con ataques de asma mode-



rados-severos presentaban niveles significativamente mayores que aquellos con asma en remisión, lo que sugiere que el sIL-2R podría ser un marcador de gravedad en el asma<sup>161</sup>.

Por el contrario, otra publicación muestra que aunque los niveles séricos de sIL-2R estaban significativamente más elevados en el grupo de los asmáticos que en el de los sanos, no hubo una diferencia significativa entre el subgrupo de asmáticos estables y aquellos con ataque agudo de asma (si bien, los niveles estaban ligeramente más elevados en los asmáticos con ataques)<sup>255</sup>.

Brown confirma la evidencia de activación de los linfocitos T en el asma, al presentar los pacientes asmáticos niveles séricos de sIL-2R significativamente mayores a los del grupo control sano, sin embargo no mostró al sIL-2R como marcador útil de la actividad de la enfermedad, debido a que las concentraciones plasmáticas de sIL-2R eran similares en los diferentes subgrupos de asmáticos (asma severo agudo, asma leve en tratamiento broncodilatador y asma crónico en tratamiento con esteroides inhalados)<sup>256</sup>.

Spahn observó niveles de sIL-2R significativamente mayores en el grupo de pacientes asmáticos crónicos mal controlados que en el grupo de controles sanos<sup>257</sup>.

Hasta ahora, los trabajos descritos tienden a demostrar que los pacientes asmáticos, independientemente de su gravedad, presentan niveles de sIL-2R significativamente superiores a los de individuos sanos no asmáticos, sin embargo, existe otra serie de trabajos que únicamente encuentran niveles elevados de sIL-2R en los asmáticos graves, como citaremos a continuación.

En uno de estos estudios se determinaron los niveles de sIL-2R en el plasma de sujetos sanos, pacientes atópicos y pacientes asmáticos, a su vez subdivididos en asma bien controlado en terapia inhaladora y asma severo agudo con tratamiento corticoide sistémico durante las últimas 48 horas. En el asma severo agudo, los niveles basales de sIL-2R estaban aumentados<sup>258</sup>.

Tang mide los niveles circulantes de sIL-2R en el suero de 15 niños sanos y 20 niños asmáticos alérgicos (con exacerbación aguda y con asma estable). La concentración sérica fue significativamente mayor en niños con exacerbación aguda de asma que en asma estable o controles sanos<sup>259</sup>.

En los trabajos de Sahid<sup>260</sup> y Li<sup>261</sup>, la concentración sérica de sIL-2R estaba significativamente más elevada en el grupo de asmáticos agudos que en el grupo control no asmático.

Otro estudio midió la concentración de sIL-2R en extractos de esputo de pacientes asmáticos con ataques agudos o en remisión. El sIL-2R se detectó en el 43% de los extractos de esputo de pacientes con ataques de asma, pero no en el de los pacientes en remisión, siendo esta diferencia significativa<sup>262</sup>.

Para algunos autores, los niveles de sIL-2R son proporcionales a la gravedad del asma, o lo que sería lo mismo, al grado de activación del linfocito T, sin que esto signifique que el sIL-2R pueda ser utilizado como marcador de gravedad del asma, como veremos en los trabajos a continuación citados.

Kim midió los niveles séricos de sIL-2R en 50 niños asmáticos con exacerbaciones agudas y en la remisión clínica. Los niveles séricos de sIL-2R fueron significativamente mayores en la exacerbación aguda que en la remisión clínica, y se correlacionaban positivamente con la severidad de la exacerbación, medida por el FEV<sub>1</sub>. Los niveles en la remisión clínica eran significativamente mayores que los de sujetos sanos controles. Concluyen que la activación celular T, caracterizada por la elevación de sIL-2R, es proporcional al grado de actividad de la enfermedad<sup>263</sup>.

Sin embargo, Schultz<sup>264</sup> cuestiona las conclusiones del trabajo de Kim, pues en dicho trabajo existe un solapamiento entre los niveles de sIL-2R de pacientes asmáticos con exa-

cepción de asma y asmáticos en remisión en 39 de los 50 casos analizados, y el grado de elevación de sIL-2R en los asmáticos exacerbados, respecto a los asmáticos en remisión y controles sanos, es pequeño en comparación con el que se produce en otras enfermedades dependientes de la activación celular T.

Otro trabajo compara los niveles séricos de sIL-2R en 26 pacientes con asma agudo severo antes de iniciar corticoides sistémicos, 15 pacientes con asma estable y 13 controles sanos. Los niveles de sIL-2R fueron significativamente mayores en los asmáticos agudos que en los estables, que a su vez tenían niveles significativamente mayores a los controles. 11 pacientes asmáticos agudos y 11 pacientes asmáticos estables no excedieron el límite superior de los sanos<sup>265</sup>. El solapamiento encontrado en los valores entre los enfermos con asma de diferente severidad y los controles excluiría su uso clínico como indicador de la severidad del asma bronquial.

No todos los trabajos que determinan el sIL-2R en el asma encuentran diferencias en los niveles de este receptor soluble al compararlo con los niveles de sujetos sanos.

Así, Moens encuentra niveles séricos significativamente mayores de sIL-2R en el grupo de niños asmáticos extrínsecos en comparación con el grupo control sano, sin embargo, no encuentra diferencias entre el grupo de adultos asmáticos y de adultos controles. El grupo de niños tenía niveles de sIL-2R significativamente mayores que el grupo de adulto, tanto en el grupo de asmáticos como en el grupo de sanos<sup>266</sup>.

En el trabajo de Guarnaccia se midieron los niveles séricos de sIL-2R en diversos grupos (eccema atópico severo, eccema atópico leve, asma severo, asma leve y sanos) existiendo un considerable solapamiento entre los niveles de los distintos grupos, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas<sup>267</sup>.

Matsumoto tampoco encontró diferencias entre los niveles séricos de sIL-2R de niños asmáticos y controles sanos<sup>268</sup>.

Lanz compara los niveles séricos de sIL-2R de niños sanos, atópicos no asmáticos y asmáticos agudos, sin encontrar diferencias significativas entre los distintos grupos<sup>269</sup>.

En el trabajo de Schauer se determinaron los niveles de sIL-4R y sIL-2R en sangre periférica de niños con asma estable, niños con asma e infección respiratoria aguda, niños sanos con infección aguda de la vía aérea y controles sanos. La concentración de sIL-2R fue superior en los distintos grupos que en el grupo control sano, pero esta diferencia no fue significativa<sup>270</sup>.

Por último, Hoeger mide los niveles séricos de sIL-2R en 178 niños asmáticos leve-moderado y 175 controles sanos. Aunque los niveles estaban más elevados en los asmáticos que en los controles, esta diferencia no era estadísticamente significativa. Los niveles de sIL-2R fueron inversamente proporcional a la edad en ambos grupos. Se encontró una correlación significativa entre el sCD25, el *score* de severidad de asma y el FEV<sub>1</sub> en los niños menores de 10 años<sup>271</sup>.

Como hemos visto, existe numerosos trabajos que tratan de responder a la pregunta que nos hicimos: ¿Existen diferencias en los niveles de sIL-2R entre una población normal sana de referencia y los enfermos asmáticos?. La mayoría de los trabajos citados han interpretado la elevación de los niveles de sIL-2R como marcador de la existencia de asma o de gravedad en el asma, debido a que los niveles de sIL-2R en el asma agudo o crónico mal controlado eran superiores a los hallados en el asma estable, y estos a su vez mayores que los encontrados en controles sanos. Sin embargo esto no ocurre siempre así, ya que en otros trabajos no se encuentra relación entre los niveles de sIL-2R y la severidad del asma, como demuestran publicaciones en las que se describen solapamientos entre los niveles de sIL-2R de pacientes asmáticos agudos y pacientes asmáticos estables, ausencia de diferencias entre los niveles de pacientes asmáticos, cualquiera que sea su grado de asma (leve, moderado o severo), y ausencia de diferencias entre los niveles de asmáticos asintomáticos y controles sanos. Esto ha llevado a cuestionar la utilidad de este factor en la práctica clínica.

Con objeto de esclarecer la discrepancia encontrada en la literatura, nosotros medimos los niveles de sIL-2R en dos grupos de población: 1) pacientes asmáticos extrínsecos sensibles al polen de gramíneas no sometidos a hiposensibilización y 2) sanos, no asmáticos, que se tomaron como controles. La determinación de los niveles se realizó en dos momentos distintos: Tiempo 1, T1) antes de la estación polínica, cuando los pacientes no están expuestos al antígeno al que son sensibles y Tiempo 2, T2) durante la estación polínica, cuando los pacientes asmáticos están expuestos al alergeno al que son sensibles.

No encontramos diferencias entre los niveles de sIL-2R de los controles sanos medidos antes de la primavera (T1) y en plena primavera (T2), sin embargo, en el grupo asmático no hiposensibilizado se produce un aumento de los niveles en la primavera. Al comparar el grupo control con el grupo de asmáticos no encontramos diferencias en los niveles medidos antes de la primavera, mientras que sí las había en los niveles medidos durante la primavera.

Algunas consideraciones sobre la literatura existente. Según nuestra experiencia, cuando los pacientes asmáticos no están expuestos, los niveles de sIL-2R no se diferencian de aquellos medidos en sanos, mientras que durante la estación polínica existe una mayor producción de sIL-2R en los enfermos con asma, por lo que concluimos que la producción de sIL-2R sería más un reflejo de exposición (y por tanto de síntomas, ya que durante la exposición es cuando estos aparecen) que del hecho de ser asmático. Esto podría explicar las discrepancias encontradas en la literatura, puesto que aquellos artículos que encuentran niveles de sIL-2R significativamente mayores en los enfermos asmáticos respecto a los controles sanos, o en los enfermos más graves o con ataque de asma, están reflejando un nivel de exposición aumentado, mayor o menor, que marca una producción aumentada de sIL-2R respecto al grupo de sanos.

Existe un trabajo donde se pretendía observar si la evitación del alergeno en asmáticos alérgicos disminuía los niveles de sIL-2R o producía cambios en una serie de parámetros seleccionados. Se seleccionó un grupo de niños asmáticos a ácaros del polvo doméstico,

y la evitación se realizó cubriendo los colchones, almohadas y mantas con una cubierta especial. Los efectos se compararon con un grupo control donde se utilizaron cubiertas placebo. Aunque la concentración del alérgeno se redujo significativamente, no hubo una significativa mejoría en los síntomas de asma, valores del PEF, uso de broncodilatadores ni PC<sub>20</sub> a histamina. Los niveles séricos de sIL-2R y de la PCE permanecieron inalterados tanto utilizando cubiertas placebo como activas<sup>272</sup>. Probablemente, los pacientes siguieron expuestos a los ácaros, lo cual es evidente, puesto que continuaban con síntomas. Aunque se evitaron acúmulos de ácaros en colchones y mantas, no se efectuaron medidas de evitación en el resto del ambiente habitual de los pacientes (ejemplo, si había moquetas, alfombras, libros, etc.).

¿Cuál sería la explicación por la que en otros estudios, los niveles de los pacientes asmáticos no se diferencien del de los sujetos sanos o de que exista solapamiento entre los niveles de los distintos grupos? En primer lugar, ya hemos comentado que la elevación de los niveles de sIL-2R es, a la vista de los resultados obtenidos, reflejo de exposición en el paciente asmático extrínseco, lo cual quiere decir, que cuando el paciente asmático no está expuesto los niveles de sIL-2R no se diferenciarían del de los controles sanos. Como crítica, algunos de estos estudios no diferencian entre asmáticos extrínsecos o intrínsecos, siendo el objeto de nuestro estudio los pacientes asmáticos extrínsecos. En segundo lugar, nuestro trabajo plantea la determinación de los niveles de sIL-2R *in vitro*, en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, mientras que en ninguno de los trabajos citados se plantea en estos términos, determinando la mayoría de ellos los niveles de sIL-2R en suero. Creemos que nuestra técnica es más sensible, ya que las pequeñas cantidades de sIL-2R en suero pueden modificarse menos debido al “factor diluyente” de toda la masa sanguínea sobre una producción auto o paracrina. Sin embargo, parte de los linfocitos en sangre periférica poseen la capacidad de estar estimulados y poder remedar los efectos ocasionados en el órgano de choque. Al ser estimulados con PHA, se amplificaría la producción de sIL-2R, siendo más evidentes las modificaciones de sus niveles. Esto podría explicar los hallazgos encontrados en los distintos estudios referidos.

## **2. sIL-2R e inmunoterapia ¿Induce la inmunoterapia modificaciones en la producción de sIL-2R?. ¿Existen diferencias en cuanto a la producción de sIL-2R, entre las pautas de inmunoterapia preestacional y la coestacional?**

Con objeto de responder a esta cuestión, en nuestro estudio medimos los niveles de sIL-2R en dos momentos distintos: Tiempo 1, T1) antes de la estación polínica, cuando los pacientes no están expuestos al antígeno al que son sensibles y Tiempo 2, T2) durante la estación polínica, cuando los pacientes asmáticos están expuestos al alérgeno al que son sensibles. Estas determinaciones se hicieron en el grupo de controles sanos y asmáticos extrínsecos sensibles al polen de gramíneas (que no había recibido inmunoterapia), citados anteriormente, y en dos grupos de pacientes asmáticos extrínsecos sensibles al polen de gramíneas, que habían recibido inmunoterapia específica durante 3 años: 1) pacientes que habían recibido inmunoterapia específica preestacional y 2) pacientes que habían recibido inmunoterapia específica coestacional.

En el grupo con inmunoterapia coestacional, no encontramos diferencias significativas en la producción de sIL-2R medida en los tiempos T1 y T2. Sin embargo, en el grupo con inmunoterapia preestacional, sí existían diferencias significativas en la producción de sIL-2R medida en los tiempos T1 y T2. Aunque la inmunoterapia preestacional provoca durante la época de polinización un descenso significativo de los niveles de sIL-2R respecto a los pacientes que no han realizado inmunoterapia, esta bajada no es lo suficientemente importante como para que no haya diferencias entre los niveles del tiempo T1 y T2 en los pacientes con inmunoterapia preestacional. Mientras que en T2 no existen diferencias entre los niveles de sIL-2R de los sanos y aquellos inmunizados con inmunoterapia coestacional, sí encontramos diferencias entre los niveles de los sanos y los de los pacientes inmunizados con inmunoterapia preestacional.

Por tanto, concluimos que la inmunoterapia coestacional se mostraría como un factor inhibidor de la producción de sIL-2R en enfermos asmáticos extrínsecos durante la exposición al alérgeno al que son sensibles. En este modelo, la inmunoterapia coestacional induce

una normalización de los valores de sIL-2R entre el tiempo T1 y T2, que la preestacional no haría. La determinación de los niveles de sIL-2R medidos en el sobrenadante de cultivos celulares, podría servir como marcador útil de la efectividad de la inmunoterapia en pacientes asmáticos extrínsecos.

Aunque son escasas las publicaciones existentes sobre los niveles de sIL-2R en pacientes asmáticos sometidos a inmunoterapia, su comentario nos parece interesante.

En primer lugar citaremos tres trabajos realizados por el grupo de Ohashi en el campo de la inmunoterapia en la rinitis alérgica. Aunque los tres estudios se refieren a pacientes con rinitis alérgica y en el nuestro se trata de pacientes asmáticos, salvando las distancias, los resultados de estos estudios son interesantes de comentar.

En el primero de los trabajos hicieron un seguimiento de 47 pacientes con rinitis alérgica perenne a *Dermatophagoides faringe* durante 10 años. 27 fueron tratados con inmunoterapia y 20 no. Los niveles de sIL-2R disminuyeron significativamente en el grupo tratado. La velocidad de descenso de sIL-2R se correlacionó con la velocidad del descenso del score de síntomas durante los 3 primeros años únicamente<sup>273</sup>.

En el segundo estudio se determinó la concentración sérica de sIL-2R en 48 pacientes con rinitis alérgica perenne, antes y tras tratamiento inmunoterápico, tomándose como control 14 sujetos sanos no atópicos. Antes de la inmunoterapia los niveles de sIL-2R eran significativamente más elevados en los sujetos con rinitis que en los sanos. Tras inmunoterapia, los niveles descendían hasta no ser significativamente distintos del de los sujetos sanos. El porcentaje de descenso de sIL-2R se correlacionaba directamente con la duración de la inmunoterapia<sup>274</sup>.

De particular interés, por la analogía con nuestro trabajo en los tiempos de determinación de la muestra, es el tercer estudio que citaremos del grupo de Ohashi. Se obtuvieron muestras de sIL-2R de pacientes con rinitis alérgica estacional antes y durante la estación



polínica. La inmunoterapia suprimía la elevación estacional de sIL-2R sérica en aquellos pacientes que presentaban mejoría clínica pero no en aquellos poco respondedores al tratamiento. El aumento estacional de sIL-2R se correlacionaba inversamente con la duración de la inmunoterapia. Los cambios estacionales en los niveles de sIL-2R sérica pueden servir como marcador del beneficio clínico de la inmunoterapia<sup>275</sup>.

A la vista de estos trabajos se concluye que la inmunoterapia disminuye los niveles de sIL-2R de los pacientes con rinitis alérgica perenne, así como el aumento estacional de los niveles de sIL-2R de los pacientes con rinitis alérgica estacional. Estos estudios realizados en pacientes con rinitis alérgica concluyen de forma similar a nuestros hallazgos en pacientes asmáticos.

En lo que respecta a pacientes asmáticos sometidos a hiposensibilización, son también escasos los trabajos que hemos encontrado en la literatura médica sobre la influencia de la inmunoterapia en los valores del sIL-2R. De los trabajos encontrados, tan sólo uno de ellos investiga la producción de sIL-2R en cultivos celulares, al igual que nosotros.

Reich midió los niveles plasmáticos del sIL-2R en un grupo de pacientes asmáticos extrínsecos sometidos a inmunoterapia sublingual y utilizó como control un grupo de sanos. Tras un año de inmunoterapia, los niveles del sIL-2R disminuyeron significativamente<sup>219</sup>.

En el trabajo de Park, 15 asmáticos estacionarios moderados-severos recibieron inmunoterapia al polen *Hop Japanese* (polen de la familia de los cannabináceos, causante en Corea de importantes polinosis en otoño), al que eran sensibles, durante más de un año. El *score* de síntomas, la reactividad cutánea y el grado de reactividad de la vía aérea fueron monitorizados, midiéndose antes de la inmunoterapia y un año tras la misma. También se midieron los niveles séricos de IgE total, IgE específica, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>4</sub>, sIL-2R, sCD23 e IL-10 antes de la inmunoterapia, al final de la terapia inicial y un año tras la misma. Los niveles de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>4</sub> comenzaron a aumentar de forma significativa al final de la terapia inicial, con un significativo descenso del *score* de síntomas, mientras que la IgE total y específica

mostraron variables respuestas durante la inmunoterapia, sin significación estadística. Los niveles de sIL-2R descendieron significativamente tras un año de inmunoterapia, mientras que no hubo cambios significativos en los niveles de sCD23 e IL-10, ni en la reactividad cutánea o hiperreactividad de la vía aérea a metacolina<sup>220</sup>.

Respecto al trabajo de Park, comentar que los pacientes seleccionados comenzaron la inmunoterapia 1 mes tras finalizar la estación polínica, para excluir el efecto de la estación polínica y que los niveles de sIL-2R se midieron antes de iniciar la inmunoterapia y tras 1 año de la misma. Está claro que un año tras la inmunoterapia no estaban en la estación polínica, pero no especifica si la determinación de sIL-2R antes de iniciar la inmunoterapia estaba solapada con la estación polínica. Pudiera darse la circunstancia en este trabajo de que los niveles de sIL-2R elevados antes de iniciar la inmunoterapia se debieran a la exposición ambiental por la estación polínica, y que los niveles disminuidos tras un año de inmunoterapia se deban, no a la inmunoterapia, sino a no estar bajo el efecto de la exposición ambiental (en nuestro estudio no detectamos niveles elevados de sIL-2R en asmáticos en comparación con una población sana cuando son medidos fuera de la estación polínica). Pensamos que para ver el efecto de la inmunoterapia, los niveles de sIL-2R debieron medirse durante la estación polínica (que es cuando se elevan) y no fuera de esta.

En el trabajo de Moens seleccionaron tres grupos de niños: sanos, asmáticos extrínsecos a ácaros del polvo doméstico y asmáticos extrínsecos a ácaros del polvo doméstico hiposensibilizados durante al menos 8 meses. Los niveles séricos de sIL-2R fueron significativamente mayores en asmáticos no hiposensibilizados que en asmáticos hiposensibilizados o controles sanos. En este ensayo, también se mide la respuesta proliferativa linfocitaria in vitro a ácaros del polvo doméstico, al ser los linfocitos cultivados con un extracto de *D. Pteronyssinus*. El número de linfocitos CD3+CD25+ no varía tras la estimulación con el extracto de ácaros, pero la densidad del CD25 sí varía (cuando los linfocitos no se estimulan, la densidad del CD25 es similar en los tres grupos), de forma que existe un aumento significativo tras la estimulación en niños sanos (p: 0.008) y en los pacientes con inmunoterapia (p:

0.005), pero este aumento no es significativo (p: 0.09) en los niños asmáticos sin inmunoterapia. Los autores no se explican este hallazgo<sup>221</sup>.

Los trabajos de Reich y Park concluyen que la inmunoterapia disminuye los niveles de sIL-2R en pacientes asmáticos extrínsecos, al igual que nosotros. El trabajo de Moens, también encuentra un descenso de estos niveles en los pacientes hiposensibilizados cuando el sIL-2R se determina en suero, sin embargo, al medir la densidad del CD25 en linfocitos estimulados con ácaros a los que son sensibles, encuentran que la densidad del CD25, que será la fuente del sIL-2R, aumenta significativamente en los sanos y en aquellos que recibieron inmunoterapia y sin embargo no aumenta de forma significativa en los que no han recibido inmunoterapia.

Algunos comentarios por nuestra parte respecto a este hecho. En el trabajo de Moens, el grupo con inmunoterapia es muy heterogéneo, ya que la inmunoterapia la tienen entre 8 y 60 meses. El estudio no indica la proporción ni donde se encuentra la mayoría. Si esta fuera de 8 meses, pocos efectos pueden esperarse de la inmunoterapia en ese tiempo de tratamiento. Por otra parte, existen evidencias de efectos desde “paradójicos” a “raros” con los cultivos in vitro de linfocitos con alérgenos, y sobre todo con los ácaros. Parece que pudieran existir varios factores para explicar estos hallazgos:

-Factores dependientes de la fuente y purificación del extracto empleado.

-Factores dependientes de los medios empleados en el cultivo. Posteriormente al trabajo de Moens, se ha demostrado<sup>276</sup> que el empleo de medios de cultivo libre de suero (en el apartado material y método del trabajo de Moens, en el subapartado “Lymphoproliferative response to HDM”, dicen que emplean: “serum-free AIM-V médium-Gibco Life Technologies, Ghent, Belgium”) estimula inespecíficamente los cultivos de linfocitos, no habiendo diferencias entre los sujetos que son alérgicos y los que no. Esta es posiblemente la explicación para los hallazgos contradictorios encontrados en el trabajo de Moens.

En el trabajo de Bonno, no se determinan los niveles de sIL-2R, sino la densidad de IL-2R en células CD4 y CD8 estimuladas con extracto de ácaros. Se seleccionan niños con asma sensible a ácaros que han recibido inmunoterapia y niños con asma sensibles a ácaros que no la han recibido y determinan la expresión de IL-2R en células CD4 y CD8 estimuladas con extracto de ácaros. Se utiliza un tercer grupo de sanos como controles. La densidad del CD25 en los linfocitos CD4 aumentó de forma significativa tanto en el grupo con inmunoterapia como en el grupo sin ella (sin haber diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos). Por otra parte, la densidad del CD25 en los linfocitos CD8 sólo aumentó de forma significativa en el grupo tratado con inmunoterapia<sup>277</sup>, concluyendo que la eficacia de la inmunoterapia con ácaros se debería a la generación de linfocitos T supresores CD8 antígeno específicos.

Por último citaremos el trabajo de Hsieh. Se midieron los niveles séricos de sIL-2R y la producción in vitro de sIL-2R (al igual que nosotros). Se escogió un grupo de controles sanos, un grupo de pacientes asmáticos sensibles al polvo de casa y un grupo de pacientes asmáticos sensibles al polvo de casa que habían recibido inmunoterapia durante 2-3 años. Los niveles séricos de sIL-2R eran significativamente mayores en los pacientes asmáticos que en los controles y asmáticos hiposensibilizados. También eran significativamente mayores en los pacientes hiposensibilizados que en los controles sanos. Se preparó un extracto con polvo de las casas de los pacientes para el cultivo de linfocitos. Si se estimulaban los linfocitos con PHA no existían diferencias en la producción de sIL-2R en ninguno de los grupos (estos hallazgos coinciden con los nuestros, ya que sólo se producen diferencias en la época de síntomas o cuando provocamos al paciente y no en reposo), pero si se estimulaban con el extracto de polvo se producía una mayor producción de sIL-2R en los pacientes asmáticos que en los controles sanos, y esta producción decrecía en los pacientes sometidos a inmunoterapia (siendo la diferencia entre los sujetos sanos y los hiposensibilizados insignificante)<sup>188</sup>.

Los hallazgos del estudio de Hsieh son concordantes con los nuestros. La inmunoterapia disminuyó los niveles séricos de sIL-2R en los pacientes inmunizados. Cuando los

linfocitos son estimulados inespecíficamente (PHA) no producen sIL-2R (recordar que concluimos que sIL-2R era reflejo de exposición), sin embargo, cuando se estimulan específicamente (están expuestos) producen sIL-2R, y esta producción se ve decrecida en los pacientes sometidos a inmunoterapia. Estudios previos de este grupo, habían demostrado que tras la inmunoterapia, la respuesta linfoproliferativa de las células mononucleares a provocación con polvo de la casa decrece gradualmente, mientras que la respuesta a PHA permanece inalterada<sup>278-279</sup>. En nuestro trabajo, la PHA estimula por igual en los grupos estudiados. La diferencia entre los distintos grupos viene dada por la exposición específica a pólenes de gramíneas en la primavera y su ausencia antes de la misma, y por la presencia o ausencia de tratamiento inmunoterápico.

Es conocido que las células T activadas *in vitro*, tras un cierto número de divisiones celulares, gradualmente dejan de expresar IL-2 e IL-2R<sup>144, 280</sup>. Así, la decreciente producción de IL-2 e sIL-2R tras la inmunoterapia puede resultar de la activación celular T *in vivo* y el agotamiento debido a los repetidos estímulos alérgicos que esta supone, así como a la generación de células T supresoras, que deprimen la proliferación celular T.

Respecto a las diferencias encontradas en nuestro estudio entre las distintas pautas de inmunoterapia (preestacional-coestacional) en cuanto a la modificación de los niveles de sIL-2R, no hemos encontrado en la literatura ningún trabajo que se refiera en estos términos, siendo esta la primera evidencia de los hallazgos encontrados.

Hemos encontrado un estudio comparativo que evalúa la pauta de inmunoterapia preestacional y perenne tras 3 años de inmunoterapia, aunque sin referirse a los niveles de sIL-2R. 60 pacientes con rinitis y/o asma debida a polen de gramíneas fueron aleatoriamente asignados a recibir inmunoterapia de acuerdo a una pauta estacional o perenne. La dosis acumulativa fue 602 BU en el grupo perenne y 372 en el estacional. La frecuencia y severidad de los efectos adversos fue similar y muy baja en ambos grupos. Los niveles de IgE fueron significativamente más bajos tras la inmunoterapia perenne al final del segundo año. Fue observado un descenso estacional de los niveles de IgG específica en los pacientes con pauta

estacional. Los scores de síntomas y medicación no mostraron diferencias entre los dos grupos<sup>281</sup>.

Según nuestro trabajo, concluimos que la inmunoterapia coestacional se mostraría como un factor inhibidor de la producción de sIL-2R durante la exposición al alérgeno en pacientes asmáticos extrínsecos, mientras que la inmunoterapia preestacional no alcanza estos objetivos. Como hemos comentado con anterioridad, la decreciente producción de sIL-2R tras la inmunoterapia, posiblemente resulte de la activación celular T in vivo y el agotamiento debido a los repetidos estímulos alérgicos que esta supone. Los estímulos producidos por la inmunoterapia coestacional son constantes y repetitivos, mientras que la inmunoterapia preestacional produciría estímulos intermitentes (previos a la estación polínica, sin estimular el resto del año).

### **3. sIL-2R y provocación bronquial. ¿Podemos reproducir en el laboratorio los hallazgos obtenidos en la exposición natural?**

Hasta ahora hemos visto como la exposición natural del alérgeno a un paciente asmático sensible a este (exposición de pólenes durante la primavera a pacientes asmáticos sensibles al polen de gramíneas) produce una elevación de los niveles de sIL-2R, siendo el sIL-2R un marcador de exposición alérgica natural. También hemos observado como en los pacientes asmáticos hiposensibilizados mediante inmunoterapia alérgica específica se produce una disminución del aumento estacional de los niveles de sIL-2R, siendo no significativa dicha elevación en los pacientes que ha recibido inmunoterapia coestacional. Los hallazgos obtenidos obligan a preguntarnos: ¿Podemos reproducir en el laboratorio los hallazgos obtenidos en la exposición natural?, o dicho de otro modo: ¿Produce la exposición artificial los mismos cambios en los niveles de sIL-2R que la exposición natural?

Para responder a dicha cuestión seleccionamos 4 grupos de pacientes asmáticos sensibles al polen de gramíneas, no hiposensibilizados, que fueron expuestos a provocación bronquial, midiéndose los niveles de sIL-2R antes y después de la provocación. El primer

grupo fue expuesto a provocación bronquial específica. El segundo grupo fue expuesto al alérgeno específico mediante provocación bronquial tipo priming. El tercer grupo fue expuesto a una provocación bronquial antígeno inespecífica con un antígeno al que no eran sensibles (*pteronyssinus*) y el cuarto grupo fue expuesto a provocación bronquial inespecífica con metacolina. Mediante este diseño, no sólo responderemos a la cuestión de si la exposición artificial al alérgeno al que son sensibles los pacientes produce una elevación de los niveles de sIL-2R, sino también si el sIL-2R es un parámetro de reactividad bronquial y si la exposición a otros alérgenos, a los que el paciente no es sensible, modifica los niveles de sIL-2R.

También nos propusimos averiguar si existían diferencias entre los pacientes que presentaban reacción inmediata sólo de aquellos que presentaban reacción dual, así como si existía correlación entre los niveles de sIL-2R y los síntomas que presentan los pacientes. Para responder a esta pregunta, dividimos a los pacientes provocados específicamente en aquellos que presentaron reacción inmediata únicamente y aquellos que presentaron reacción dual. Además de medir los niveles de sIL-2R antes y después de la provocación, también se determinó, mediante cuestionario, un score o puntuación de síntomas y del uso de medicación beta 2 de corta acción de rescate.

### **3.1. sIL-2R y provocación bronquial específica. ¿Produce la exposición artificial al alérgeno al que los pacientes son sensibles una elevación de los niveles de sIL-2R?**

En nuestra experiencia, la exposición al alérgeno mediante provocación bronquial específica en pacientes asmáticos sensibles al polen de gramíneas provoca una mayor producción de sIL-2R después de la provocación.

Generalmente, los asmáticos alérgicos están continuamente expuestos en mayor o menor medida a alérgenos. El significado de la repetida exposición a los alérgenos ha sido establecido por varios investigadores. Por ejemplo, Ihre documentó que repetidas pequeñas dosis de alérgeno podía provocar una respuesta asmática inmediata y/o tardía en sujetos as-

máticos que inicialmente no mostraban reacción de la vía aérea<sup>282</sup>. El grupo de Koh mostró que dos repetidas exposiciones a una dosis de alérgeno, que era insuficiente para causar reacción de la vía aérea significativa, podía provocar tras una simple exposición una respuesta de la vía aérea en sujetos atópicos<sup>283</sup>. Si en lugar de realizar la provocación hasta que esta sea positiva, los provocamos en días distintos, con dosis que no produzcan broncoconstricción (priming), situación por otra parte más similar a lo que ocurre durante la exposición natural, donde el paciente está expuesto durante espacios variables de tiempo (durante la estación en los polínicos) a concentraciones ambientales variables de alérgeno, objetivamos que también existe una mayor producción de sIL-2R al quinto día, que cuando se comenzó con este procedimiento.

Por tanto, concluimos que la exposición al alérgeno al que los pacientes son sensibles, produce una elevación de los niveles de sIL-2R, siendo esta afirmación válida tanto si la exposición es natural como artificial. De esta forma, mediante el modelo experimental en el laboratorio hemos ratificado los hallazgos obtenidos en la exposición natural.

Son escasas y de conclusiones contradictorias las publicaciones encontradas en la literatura médica que estudien los niveles de sIL-2R bajo los efectos de la provocación bronquial.

Grammer realiza una provocación bronquial específica con isocianato a 10 pacientes con asma ocupacional por isocianatos, sin detectarse cambios en los valores de sIL-2R sérico medidos antes y 24 horas tras los máximos cambios en la función pulmonar después de la provocación. Tampoco hubo diferencias en los valores de sIL-2R tras la provocación, entre el grupo de pacientes que tuvo una provocación positiva y el grupo que tuvo una provocación negativa<sup>222</sup>. Quizás, la toma de muestras 36 y 48 horas tras la provocación pudieran haber puesto de manifiesto cambios en los niveles de sIL-2R, teniendo en cuenta que IL-2R aparece en la superficie del linfocito T entre las 18 y 24 horas tras la activación del mismo. En nuestro trabajo la determinación del sIL-2R la realizamos a las 24 horas de la provocación, al igual que el trabajo de Grammer, sin embargo nosotros sí encontramos diferencias



en los niveles de sIL-2R. Quizás, una vez más, la explicación se deba a la forma de determinar el sIL-2R. El trabajo de Grammer lo hizo en suero de sangre periférica, mientras que nosotros lo hicimos en el sobrenadante de cultivo celular. Como ya explicamos anteriormente, la determinación en suero es menos sensible para detectar pequeñas variaciones sobre una producción paracrina como es el sIL-2R.

Schmitt realizó una provocación bronquial con alérgeno en 32 niños asmáticos leves-moderados sensitivos a ácaros del polvo doméstico y 6 adultos jóvenes sanos como controles. En el grupo de los asmáticos, 6 desarrollaron una reacción temprana, 6 tardía, 23 dual y 3 no mostraron respuesta. Antes de la provocación, los niveles séricos de sIL-2R eran significativamente mayores en el grupo de asmáticos, y seguían siéndolo a las 12 y 24 horas post-provocación, sin variación durante el periodo de observación. Al dividir a los pacientes en subgrupos según el tipo de reacción (temprana, tardía, dual o no reacción), tampoco se observaron cambios en los niveles de sIL-2R (antes de la provocación y a las 12 y 24 horas) respecto al grupo completo de asmáticos, excepto para el grupo sin reacción, que mostró niveles menores, similares a los del grupo control, en las tres determinaciones<sup>223</sup>. Igualmente, pensamos que la determinación de los niveles de sIL-2R en suero no fue lo suficientemente sensible para encontrar cambios en los niveles de sIL-2R tras la provocación, y que quizás, determinaciones de sIL-2R a las 36 o 48 horas de la provocación pudieran haber puesto de manifiesto las diferencias.

Por último, citaremos el trabajo de Van Bever. En este ensayo, seleccionaron a 18 niños asmáticos extrínsecos moderados-severos a ácaros del polvo doméstico y se les expuso a una provocación bronquial específica. Como grupo control se utilizaron 18 niños sanos a los que no se provocaron. Antes y a las 24 horas de la provocación específica se determinó el sIL-2R sérico y también se realizó una provocación bronquial inespecífica con metacolina. Antes de la provocación, los niveles de sIL-2R eran significativamente mayores en el grupo de asmáticos que el grupo control, y tras la provocación específica se observó un aumento significativo (al igual que nosotros) en los valores de sIL-2R sérica<sup>224</sup>.

### **3.2. sIL-2R y provocación bronquial antígeno inespecífica.**

En nuestro estudio, la exposición mediante provocación bronquial de los pacientes asmáticos sensibles al polen de gramíneas, a un alérgeno al que no eran sensibles, como *D pteronyssinus*, no originaba una mayor producción de sIL-2R, confirmando que el sIL-2R es un marcador de exposición específica, no siendo modificado por la exposición a alérgenos a los cuales no existe hipersensibilidad.

No hemos encontrado en la literatura ningún estudio que determine los niveles de sIL-2R en asmáticos extrínsecos tras provocación con un antígeno al que no son sensibles.

### **3.3. sIL-2R y provocación bronquial inespecífica. ¿Es el sIL-2R un marcador de hiperreactividad bronquial?**

En nuestro trabajo, cuando los pacientes asmáticos extrínsecos sensibles al polen de gramíneas fueron expuestos a una provocación bronquial inespecífica con metacolina, no mostraron diferencias en la cantidad de producción de sIL-2R. Los pacientes que tenían hiperreactividad bronquial no mostraron diferencias en la cantidad de producción de sIL-2R cuando se los exponía inespecíficamente, lo cual significa que el sIL-2R no es un marcador de hiperreactividad bronquial, pues sólo si se está expuesto al antígeno específico se elevan los niveles de sIL-2R, no elevándose cuando la broncoconstricción es inespecífica.

No hemos encontrado en la literatura ningún estudio que determine los niveles de sIL-2R en asmáticos extrínsecos tras provocación inespecífica con metacolina. Si bien es cierto que en el trabajo de Van Bever<sup>224</sup> se realiza una provocación bronquial inespecífica, esta se realiza antes y después de una provocación bronquial específica, midiéndose los niveles de sIL-2R después de esta y no de aquella.

### **3.4. sIL-2R y respuesta inmediata/dual en la provocación bronquial específica. ¿Existen diferencias entre los pacientes que presentan respuesta inmediata de aquellos que presentan respuesta dual? ¿Se correlaciona el sIL-2R con la sintomatología que presentan los pacientes?**

Los pacientes que tenían una respuesta dual tras la provocación bronquial específica con antígeno, producían más cantidad de sIL-2R que los que tenían una respuesta inmediata. Existe mayor sintomatología en los pacientes que tienen respuesta dual que en los que tienen respuesta inmediata. El uso de beta 2 inhalados de rescate es mayor en los duales.

En los pacientes que tenían sólo respuesta inmediata, encontramos que existía una correlación entre el uso de beta 2 inhalado de rescate y la sintomatología que tenían los pacientes, pero no entre los niveles de sIL-2R tras la provocación y la cantidad de medicación utilizada o la sintomatología de los pacientes.

En los pacientes que presentaron respuesta dual, existía correlación entre el uso de beta 2 inhalados de rescate y la sintomatología. También existía correlación entre los niveles de sIL-2R medidos tras la provocación y la cantidad de medicación utilizada, así como entre dichos niveles de sIL-2R y el score de síntomas.

Parece que la correlación entre la cantidad de sIL-2R y la sintomatología depende de que el paciente tenga una respuesta dual en su provocación bronquial.

En el trabajo de Schmitt<sup>223</sup>, no sólo no encuentran diferencias en los niveles de sIL-2R tras la provocación bronquial, sino que tampoco encuentran diferencias entre los niveles de los distintos subgrupos analizados según el tipo de reacción (temprana, tardía, dual). Si la determinación del sIL-2R en suero es poco sensible, a nuestro parecer, para detectar cambios en los niveles de estos, también lo será para encontrar diferencias entre los subgrupos analizados.

En el trabajo referido de Van Bever<sup>224</sup>, excepto uno, todos los pacientes mostraron una respuesta dual, por lo que no compararon como nosotros a los que tuvieron respuesta inmediata con los que la tuvieron dual. Se encontró una correlación entre la PD<sub>20</sub> (específica) de la respuesta inmediata y la PD<sub>20</sub> (histamina) previa a la provocación específica. Tras la provocación bronquial específica se produjo un significativo descenso de la PD<sub>20</sub> histamina, excepto en el paciente que no presentó respuesta tardía. La severidad de la respuesta tardía (mostrada por el grado de descenso del FEV<sub>1</sub> durante el periodo de 1 a 8 horas post-provocación) tendía a correlacionarse con el aumento del sIL-2R sérico (r:0.48, p:0.05). En conclusión, el aumento de los niveles de sIL-2R tras la provocación específica, tendía a correlacionarse con el descenso del FEV<sub>1</sub> durante la respuesta tardía. Al igual que nosotros, encuentran una correlación entre los niveles de sIL-2R y la sintomatología en los pacientes que tienen respuesta dual, sugiriendo que los linfocitos T están involucrados en el proceso inflamatorio de la reacción tardía al alergen.

Respecto a si el sIL-2R es un parámetro que se correlacione con la sintomatología, ya comentamos, al inicio de la discusión, como había muchos trabajos que detectaban niveles elevados de sIL-2R en pacientes asmáticos, independientemente de la gravedad, mientras que otros sólo los detectaban en los pacientes asmáticos agudos o más sintomáticos, poniendo estos últimos en evidencia una posible correlación entre el sIL-2R y la sintomatología. Aparte de lo que comentamos al respecto, una posible explicación para esta diferencia entre los distintos trabajos sería el hallazgo que hemos obtenido en nuestro estudio de que sólo existe correlación entre el sIL-2R y la sintomatología en aquellos pacientes que presentan respuesta dual. El sIL-2R no sólo se relaciona con la exposición al alergen, sino que esta relación es mayor en los pacientes más sintomáticos, los duales.

Algunas consideraciones por nuestra parte sobre estos hallazgos. Nos preguntamos por qué existe una correlación entre el sIL-2R y la sintomatología de los pacientes únicamente en aquellos que presentan reacción tardía. La respuesta posiblemente se encuentre en la fisiopatología de la reacción inmediata y tardía.

Como hemos explicado previamente, la fase inmediata se inicia rápidamente tras la estimulación del antígeno. En su patogenia intervienen las células captadoras del antígeno, así como otras células que liberarán mediadores inflamatorios, que actuarán sobre las estructuras bronquiales. Principalmente intervienen los mastocitos sobre todo, pero también los basófilos, los macrófagos alveolares, los linfocitos y las plaquetas. Los mediadores liberados (histamina, heparina, factor quimiotáctico de los neutrófilos, triptasa y otras enzimas) producirán la vasodilatación y edema de la mucosa, broncoconstricción y aumento de la secreción mucosa, así como la activación del complemento por la vía alternativa (que producirá quimioatracción y activación de los neutrófilos y eosinófilos). La fase tardía se desarrolla a las 4-8 horas de la fase inmediata, con aparición de broncoconstricción y edema en la submucosa, así como infiltración abundante de células inflamatorias (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, mastocitos y linfocitos T helper) reclutadas por los factores quimiotácticos liberados en la fase anterior, en los que el eosinófilo juega un papel destacado.

Así pues, en una primera fase (respuesta inmediata) predomina la presentación del antígeno por las células dendríticas a los linfocitos T y la liberación de mediadores preformados, principalmente por el mastocito. En una segunda fase (respuesta tardía), con la liberación de mediadores y activación del complemento de la fase previa, se ha puesto ya en marcha el mecanismo necesario para la infiltración mucosa por células inflamatorias que perpetuarán la respuesta, siendo de estas células el eosinófilo la más destacada. De especial importancia es la actuación del linfocito T helper, el cual, como ya destacamos en la introducción, a través de la liberación de interleucinas, dirige la activación y quimioatracción de otras células al foco inflamatorio. De esta forma, la IL-5 e IL-13 estimulan la activación y quimioatracción de los eosinófilos, existiendo relación entre la eosinofilia o diversos parámetros eosinofílicos y la activación linfocitaria T, o lo que es igual, entre el sIL-2R y la sintomatología ocasionada por el eosinófilo en la fase tardía. En una primera fase (reacción inmediata), el antígeno estimula directamente a los mastocitos, liberándose mediadores que producen los síntomas, mientras que los linfocitos están siendo estimulados por las células presentadoras, y el nivel de activación linfocitaria no es aún significativo como para que exista una clara correlación entre esta activación linfocitaria (sIL-2R) y la sintomatología.

Son significativos los estudios realizados que relacionan al eosinófilo o nivel de activación del eosinófilo con la activación linfocitaria T, o lo que es lo mismo, con el sIL-2R.

De esta forma, Stelmach encontró una correlación entre los niveles de PCE y sIL-2R, en un grupo de niños con asma extrínseco leve-moderado, antes y tras 4 semanas de tratamiento con corticoides inhalados<sup>284</sup>. Wang también encuentra una correlación entre los niveles séricos de sIL-2R y PCE en los pacientes asmáticos, así como cifras significativamente elevadas de ambos parámetros al compararlas con las de un grupo control sano<sup>251</sup>.

Lasalle también encuentra una significativa correlación entre los niveles de sIL-2R y FEV<sub>1</sub> así como entre los niveles de sIL-2R y la eosinofilia sanguínea en un grupo de pacientes asmáticos no atópicos sin terapia corticoidea<sup>285</sup>.

Park demuestra que la concentración de sIL-2R medida en el lavado broncoalveolar de pacientes con asma se correlaciona con la concentración de IL-2, y que esta, la IL-2, está inversamente relacionada con el FEV<sub>1</sub> en los pacientes asmáticos sintomáticos. Por otra parte, el porcentaje de eosinófilos mostró una correlación significativa con los niveles de IL-2 y sIL-2R en los pacientes con asma<sup>250</sup>. Otro estudio, también de Park, prueba la correlación existente entre la concentración de sIL-2R medida en el lavado broncoalveolar de sujetos asmáticos y el porcentaje de expresión de IL-2R en los linfocitos T. El porcentaje de eosinófilos en el lavado broncoalveolar mostró una significativa correlación con los niveles de sIL-2R, y los niveles de sIL-2R también se correlacionaron negativamente con el FEV<sub>1</sub> y el PEF<sup>246</sup>. Los dos trabajos referidos de Park apoyan la relación existente entre la activación del linfocito T helper y la infiltración eosinofílica en el árbol bronquial de los asmáticos.

Hemos comprobado como la inmunoterapia disminuye la elevación de los niveles de sIL-2R que se produce cuando los pacientes asmáticos se exponen al antígeno específico. También hemos comprobado como existe una correlación entre la sintomatología que presentan los pacientes y los niveles del sIL-2R en aquellos pacientes que presentan una res-

puesta tardía. Es de interés citar, que tanto Van Bever<sup>286</sup> como el grupo de Warner<sup>287</sup> describen un descenso de la respuesta asmática tardía en la provocación bronquial a *D. pteronysinus* en el grupo de pacientes que realizaron un año de tratamiento inmunoterápico.





## **VIII. RESUMEN**



No se puede hablar de la patogenia del asma sin referirnos a las células que actúan en la reacción alérgica y a los mediadores liberados por estas. De todas las células implicadas, el papel del linfocito T es destacado, pues gracias a su función organizadora, a través del reconocimiento del antígeno alérgico que le es presentado y de la liberación de interleucinas, pondrá en marcha la activación o reclutamiento de otras células, que a su vez, actuarán como células efectoras a través de la liberación de otros mediadores.

El linfocito T se activa tras reconocer al antígeno específico, liberando IL-2 y expresando IL-2R en la superficie celular. La IL-2 liberada actuará de forma autocrina y paracrina sobre el IL-2R, estimulando la proliferación celular y la adquisición del perfil T helper 2. En el proceso de activación se libera de la superficie del linfocito T una fracción del IL-2R, el sIL-2R, el cual puede ser medido en diversos fluidos, siendo este receptor soluble el objeto de nuestro estudio.

Nos propusimos este trabajo porque aunque en la literatura existen estudios sobre el sIL-2R en el asma bronquial, la interpretación de sus niveles o la utilidad clínica en el diagnóstico, seguimiento o pronóstico de los pacientes asmáticos es controvertida. Esto se debe a que los diversos trabajos publicados han interpretado la elevación de los niveles de sIL-2R como marcador de la existencia de asma o de gravedad en el asma, existiendo contradicciones entre ellos, pues unos encuentran niveles elevados en los pacientes asmáticos independientemente de su gravedad, otros en los pacientes asmáticos graves, y otros no encuentran diferencias con los controles sanos. También son escasos los trabajos referentes al comportamiento de los niveles de sIL-2R ante la provocación bronquial o ante la inmunoterapia, por todo lo cual se ha cuestionado la utilidad del sIL-2R en la práctica clínica.

Con nuestro trabajo pretendimos determinar la utilidad del sIL-2R como parámetro de exposición y tolerancia alérgica en pacientes asmáticos extrínsecos. Pensamos que este factor soluble habría que interpretarlo como parámetro de exposición alérgica en lugar de indicador de la existencia de asma, y que por tanto también pudiera utilizarse como paráme-

tro de tolerabilidad alérgica en individuos sometidos a inmunoterapia. A diferencia de los trabajos publicados, el nuestro planteó la determinación de los niveles de sIL-2R en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, con objeto de hacer más evidentes las modificaciones de los niveles de sIL-2R, que quizás otros estudios no lograron mostrar debido a que estas determinaciones se realizaban en suero.

En este sentido, planteamos un estudio en pacientes asmáticos extrínsecos sensibles a polen de gramíneas, en el que el sIL-2R se midió en dos momentos distintos: antes de la estación polínica, cuando el paciente no está expuesto al alérgeno, y durante la estación polínica, cuando está expuesto al alérgeno de una forma natural. El estudio de los niveles de sIL-2R, en estos dos momentos, en personas sanas (grupo control) y pacientes asmáticos polínicos no hiposensibilizados, puso de manifiesto que en el grupo asmático no hiposensibilizado se produce un aumento de los niveles en la primavera. Al comparar el grupo control con el grupo de asmáticos no encontramos diferencias en los niveles medidos antes de la primavera, mientras que sí las había en los niveles medidos durante la primavera. Parece ser, a la vista de este resultado, que el sIL-2R es un parámetro de exposición alérgica y que mientras que el paciente asmático no está expuesto no tiene por qué tener niveles elevados de sIL-2R, siendo indistinguibles de los niveles de los controles sanos.

En segundo lugar, nos planteamos que si el sIL-2R era un parámetro de exposición alérgica, también podría serlo de tolerabilidad en pacientes inmunizados mediante inmunoterapia, por lo que estudiamos de igual modo (antes de la estación polínica y durante la estación polínica) a pacientes asmáticos polínicos hiposensibilizados durante 3 años con distintas pautas de inmunoterapia (preestacional y coestacional), con objeto de poder poner de manifiesto las diferencias existentes entre el grupo tratado con inmunoterapia y los anteriores (no inmunizados y controles), que no reciben inmunoterapia, y entre los distintos grupos hiposensibilizados entre sí.

En el grupo con inmunoterapia coestacional, no encontramos diferencias significativas en la producción de sIL-2R medida en los dos tiempos. Sin embargo, en el grupo con inmunoterapia preestacional, sí existían diferencias significativas en la producción de sIL-2R medida en los dos tiempos. Aunque la inmunoterapia preestacional provoca durante la época de polinización un descenso significativo de los niveles de sIL-2R respecto a los pacientes que no han realizado inmunoterapia, esta bajada no es lo suficientemente importante como para que no haya diferencias entre los niveles medidos antes de la estación polínica y durante la estación polínica. Por tanto, concluimos que la inmunoterapia coestacional se mostraría como un factor inhibidor de la producción de sIL-2R en pacientes asmáticos extrínsecos, durante la exposición al alérgeno al que son sensibles. En este modelo, la inmunoterapia coestacional induce una normalización de los valores de sIL-2R durante la estación polínica, que la preestacional no haría. La determinación de los niveles de sIL-2R medidos en el sobrenadante de cultivos celulares, podría servir como marcador útil de la efectividad de la inmunoterapia en pacientes asmáticos extrínsecos.

Los hallazgos obtenidos obligaban a preguntarnos si podíamos reproducir en el laboratorio los hallazgos obtenidos en la exposición natural. Para responder a dicha cuestión seleccionamos 4 grupos de pacientes asmáticos sensibles al polen de gramíneas, no hiposensibilizados, que fueron expuestos a provocación bronquial, midiéndose los niveles de sIL-2R antes y después de la provocación. El primer grupo fue expuesto a provocación bronquial específica. El segundo grupo fue expuesto al alérgeno específico mediante provocación bronquial tipo priming. El tercer grupo fue expuesto a una provocación bronquial antígeno inespecífica con un antígeno al que no eran sensibles (*pteronyssinus*) y el cuarto grupo fue expuesto a provocación bronquial inespecífica con metacolina.

En nuestra experiencia, la exposición al alérgeno mediante provocación bronquial específica en pacientes asmáticos sensibles al polen de gramíneas provoca una mayor producción de sIL-2R después de la provocación. Si en lugar de realizar la provocación hasta que esta sea positiva, los provocamos en días distintos, con dosis que no produzcan bronco-

constricción (priming) objetivamos que también existe una mayor producción de sIL-2R al quinto día, que antes de la provocación.

La exposición mediante provocación bronquial de los pacientes asmáticos sensibles al polen de gramíneas, a un alergeno al que no eran sensibles, como *D. pteronyssinus*, no originaba una mayor producción de sIL-2R, confirmando que el sIL-2R es un marcador de exposición específica, no siendo modificado por la exposición a alérgenos a los cuales no existe hipersensibilidad.

Cuando los pacientes asmáticos extrínsecos sensibles al polen de gramíneas fueron expuesto a una provocación bronquial inespecífica con metacolina, no mostraron diferencias en la cantidad de producción de sIL-2R, lo cual significa que el sIL-2R no es un marcador de hiperreactividad bronquial, pues sólo si se está expuesto al antígeno específico se elevan los niveles de sIL-2R, no elevándose cuando la broncoconstricción es inespecífica.

Por tanto, concluimos que la exposición al alérgeno al que los pacientes son sensibles, produce una elevación de los niveles de sIL-2R, siendo esta afirmación válida tanto si la exposición es natural como artificial. De esta forma, mediante el modelo experimental en el laboratorio hemos ratificado los hallazgos obtenidos en la exposición natural. También concluimos que el sIL-2R no es un parámetro de hiperreactividad bronquial y que la exposición a antígenos inespecíficos no modifica los niveles de sIL-2R.

Son escasas y de conclusiones contradictorias las publicaciones encontradas en la literatura médica que estudien los niveles de sIL-2R bajo los efectos de la provocación bronquial. No hemos encontrado en la literatura ningún estudio que determine los niveles de sIL-2R en asmáticos extrínsecos tras provocación con un antígeno al que no son sensible ni ningún estudio que determine los niveles de sIL-2R en asmáticos extrínsecos tras provocación inespecífica con metacolina.

En último lugar, nos propusimos averiguar si existían diferencias entre los pacientes que presentaban sólo respuesta inmediata de aquellos que presentaban respuesta dual, así como si existía correlación entre los niveles de sIL-2R y los síntomas que presentaban los pacientes. Para responder a esta pregunta, dividimos a los pacientes provocados específicamente en aquellos que presentaron respuesta inmediata únicamente y aquellos que presentaron respuesta dual. Además de medir los niveles de sIL-2R antes y después de la provocación, también se realizó, mediante cuestionario, un score o puntuación de síntomas y del uso de medicación beta 2 de corta acción de rescate durante la estación polínica.

Nuestros hallazgos fueron que los pacientes que tenían una respuesta dual tras la provocación bronquial específica con antígeno, producían más cantidad de sIL-2R que los que tenían únicamente respuesta inmediata, existía mayor sintomatología en los pacientes que tenían respuesta dual que en los que tenían respuesta inmediata, y el uso de beta 2 inhalados de rescate era mayor en los duales.

En los pacientes que tenían sólo respuesta inmediata, existía una correlación entre el uso de beta 2 inhalados de rescate y la sintomatología que tenían los pacientes, pero no entre los niveles de sIL-2R medidos tras la provocación bronquial y la cantidad de medicación utilizada o la sintomatología de los pacientes. En los pacientes que presentaron una respuesta dual, existía correlación entre el uso de beta 2 inhalados de rescate y la sintomatología, y también existía correlación entre los niveles de sIL-2R medidos tras la provocación y la cantidad de medicación utilizada, así como entre dichos niveles y la sintomatología de los pacientes.

Por tanto, la correlación entre la cantidad de sIL-2R y la sintomatología depende de que el paciente tenga una respuesta dual en su provocación bronquial. El sIL-2R no sólo se relaciona con la exposición al alérgeno, sino que esta relación es mayor en los más sintomáticos, los duales. Quizás, la explicación de este hallazgo se encuentre en la fisiopatología de la respuesta inmediata y tardía, y en la relación existente entre el linfocito T y el eosinófilo, como ya comentamos en la discusión.

A modo de resumen, diremos que aunque existen trabajos sobre el sIL-2R en el asma bronquial, ninguno se ha referido en los términos planteados por el nuestro. La mayoría de las determinaciones de sIL-2R se han realizado en suero. Muy pocos trabajos determinan el sIL-2R en pacientes sometidos a inmunoterapia y, que nosotros sepamos, sólo existe un trabajo que haya investigado la producción de sIL-2R en cultivo linfocitario de pacientes sometidos a inmunoterapia. Ningún estudio se refiere en este sentido a los pacientes asmáticos polínicos. Son muy escasos los trabajos que comparen las pautas de inmunoterapia en pacientes polínicos y ninguno lo hace en los términos referidos, y también son muy escasos, y de resultados contradictorios entre sí, los trabajos publicados que se refieran a las modificaciones ocasionadas por la provocación bronquial en los niveles de sIL-2R

Con la cuantificación del sIL-2R en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares, hemos profundizado en la fisiopatología del asma bronquial extrínseco. Hemos demostrado que el sIL-2R medido en el sobrenadante de cultivo linfocitario es un parámetro de exposición alérgica específica, tanto natural como artificial, así como de tolerabilidad alérgica en pacientes sometidos a inmunoterapia alérgica específica, siendo esta afirmación válida para la inmunoterapia coestacional. La determinación de los niveles de sIL-2R medidos en el sobrenadante de cultivos celulares, podría servir como marcador útil de la efectividad de la inmunoterapia en pacientes asmáticos extrínsecos. Con la determinación de los niveles de sIL-2R tras provocación bronquial específica e inespecífica hemos demostrado que el sIL-2R no es un parámetro de hiperreactividad bronquial y que la exposición a antígenos inespecíficos no modifica los niveles de sIL-2R. También hemos demostrado que los pacientes que tienen una respuesta dual en la provocación bronquial específica, producen más cantidad de sIL-2R, tienen más síntomas y usan más medicación beta 2 inhalada de rescate que los que tienen únicamente una reacción inmediata. Sólo en los pacientes que presentan una respuesta tardía hemos demostrado la existencia de una correlación entre la sintomatología que presentan los pacientes y los niveles de sIL-2R medidos tras la provocación bronquial específica.



Con nuestro trabajo planteamos diversas cuestiones que hemos tratado de contestar, sin embargo, nuevas aportaciones se hacen necesarias para avanzar en el conocimiento de los campos reseñados.



## **IX. CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. La determinación del receptor soluble de interleucina 2, en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, es un parámetro de exposición alérgica específica, tanto natural como artificial, en pacientes asmáticos alérgicos a pólenes de gramíneas.
2. La determinación del receptor soluble de interleucina 2, en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, es un parámetro de tolerancia al alérgeno en pacientes asmáticos alérgicos a pólenes de gramíneas sometidos a inmunoterapia alérgeno específica coestacional, que podría ser utilizado en el seguimiento de los mismos.
3. La inmunoterapia alérgeno específica, en pacientes asmáticos alérgicos al polen de gramíneas, produce una inhibición del ascenso estacional de los niveles del receptor soluble de interleucina 2 medidos en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, siendo esta inhibición significativa en los pacientes sometidos a inmunoterapia coestacional, y no significativa en los sometidos a inmunoterapia preestacional.
4. La determinación del receptor soluble de interleucina 2, en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, es un parámetro correlacionado con la sintomatología en los pacientes asmáticos alérgicos a pólenes de gramíneas que presentan una respuesta tardía.

5. La determinación del receptor soluble de interleucina 2, en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, no es un parámetro de hiperreactividad bronquial en pacientes asmáticos alérgicos a pólenes de gramíneas.
6. La exposición de antígenos inespecíficos mediante provocación bronquial, a pacientes asmáticos alérgicos a pólenes de gramíneas, no modifica los niveles del receptor soluble de interleucina 2 medidos en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA.
7. Los pacientes asmáticos alérgicos al polen de gramíneas que presentan una respuesta dual en la provocación bronquial específica, producen más cantidad de receptor soluble de interleucina 2, medido en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica, tienen más síntomas y usan más medicación beta 2 inhalada de rescate que los que tienen únicamente una respuesta inmediata.

## **X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**





1. Peat Jk. The epidemiology of asthma. *Curr Opin Pulm Med* 1996;2:7-15.
2. Haahtela T, Lindholm H, Bjorksten F, Koskenvuo K, Laitinen LA. Prevalence of asthma in Finnish young men. *BMJ* 1990;301:266-268.
3. Weiss KB, Gergen PJ, Hodgson TA. An economic evaluation of asthma in the United States. *N Engl J Med* 1992;326:862-866.
4. Pearce N, Weiland S, Keil U, Langridge P, Anderson HR, Strachan D, Bauman A, Young L, Gluyas P, Ruffin D, Crane J, Beasley R. Self-reporter prevalence of asthma symptoms in children in Australia, England, Germany and New Zealand: an international comparison using the ISAAC protocol. *Eur Respir J* 1993;6:1455-1461.
5. Mitchell EA. International trends in hospital admission rates for asthma. *Arch Dis Child* 1985;60:376-378.
6. Jackson R, Sears MR, Beaglehole R, Rea HH. International trends in asthma mortality: 1970 to 1985. *Chest* 1988;94:914-918.
7. Sears MR. Worldwide trends in asthma mortality. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* 1991;66:79-83.
8. Campbell MJ, Cogman GR, Holgate ST, Johnston SL. Age specific trends in asthma mortality in England and Wales, 1983-1995: results of an observational study. *BMJ* 1997; 314:1439-144.
9. Ciba Guest Symposium. Terminology, definitions and classification of chronic emphysema and related conditions. *Thorax* 1959;14:286-299.

10. Belda J, Giner J, Casan P, Sanchis J. El esputo inducido en el asma: estudio de validez y repetibilidad. *Arch Bronconeumol* 1997;33:325-330.
11. Magnussen H, Holz O. Monitoring airway inflammation in asthma by induce sputum. *Eur Respir J* 1999;13:5-7.
12. Subiza E, Subiza J, Jerez M. Aerobilia de las gramíneas en los climas de España. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 1989;4:45-50.
13. Davies RR, Smith IP. Forecasting the start and severity of the hay fever season. *Clin Allergy* 1973;3:263-267.
14. Curtis HH. The immunizingeure of hay fever. *Med News* 1900;77:16-19.
15. Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 1911;1:1572-1573.
16. Garcia BE, Sanz ML, de las Marismas MD, Oehling A. Modifications in IgG subclasses in the course of immunotherapy with grass pollen. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1993;3:19-25.
17. Oehling A, Sanz ML, García B. Immunological parameters in the immunotherapy follow-up. *Int Arch Allergy Immunol* 1992;99:474-477.
18. Tokushima M, Sanz ML, de las Marismas MD, Oehling A. Changes in the lymphocyte response and in the production of IgE regulatory factors in relation to the course of immunotherapy. *Allergol Immunopathol* 1990;18:127-133.
19. Malling HJ. EAAACI immunotherapy position paper. *Allergy* 1988;43(supl 6):7-35.

20. Malling HJ, Weeke B and EAAACI Immunotherapy Subcommittee. Position paper: Immunotherapy. *Allergy* 1993;48(supl 14):9-35.
21. Frew AJ. Injection immunotherapy. British Society for Allergy and Clinical Immunology. Working Party. *BMJ* 1993;307:912-922.
22. World Health Organization, American academy of Allergy, Asthma and Immunology. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;81 (5 Pt 1):501-505.
23. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, American College of Allergy, Asthma and Immunology. Allergen Immunotherapy: a practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003;99:1-40.
24. Des Roches A, Paradis L, Menardo JL, Bouges S, Danrés JP, Bousquet J. Immunotherapy with a standardized D. Pteronyssinus extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:450-453.
25. Abramson M, Puy R, Weiner J. Immunotherapy in asthma: an updated systematic review. *Allergy* 1999;54:1.022-1.041.
26. Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Allergen Immunotherapy in Asthma. *Cochrane Database syst Rev* 2003, Issue 4, Art N° CD001186.
27. Turkeltaub PC. In vivo methods of standardization. *Clin Rev Allergy* 1986;4:371-387.
28. Aas K, Backman A, Belin L, Weeke B. Standardization of allergen extracts with appropriate methods. *Allergy* 1978;33:130-137.

29. Brighton WD, Topping MD, Henocq E. Activity units for allergen extracts. *Clin Allergy* 1979;9:591-596.
30. Lombardero M, González R, Duffort O, Juan F, Ayuso R, Ventas P, Cortes C, Carreira J. Evaluación de la actividad biológica total y comparación alérgica de extractos alérgicos. *Allergol Immunopathol* 1986;14:189-198.
31. Lahoz Navarro C. Bases inmunológicas de la inmunoterapia. Academia Médica Quirúrgica Española, Monográfico sobre inmunoterapia. Bayer 1995;41-51.
32. Blanco A. Mecanismos inmunopatológicos de la inmunoterapia. *Am Esp Pediatr* 1992;36 (supl 46):53-56.
33. Miguel Lozano R, Guerra Pasadas F, Arenas Vacas A, Daza Muñoz JC, Torres M. Monitoring of various types of immunotherapy with gramineal pollens. II. Variation of humoral immunochemical parameters. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1992;20:235-239.
34. Lichtenstein L, Ishizaka K, Norman P, Sobotka A, Hill B. IgE antibody measurements in ragweed hay fever. Relationship to clinical severity and the results of immunotherapy. *J Clin Invest* 1973;52:472-482.
35. Stadler BM. A new concept for human IgE regulation. *ACI News* 1991;3:53-57.
36. Aalberse RC, Dieges PH, Knul-Bretlova V, Vooren P, Aalberg M, Leeuwen J. IgG4 as blocking antibody. *Clin Rev Allergy* 1983;1:289-302.
37. Kahn RH, Szewczuk MR, Day JH. Bee venom anti-idiotypic antibody is associated with protection in beekeepers and bee sting-sensitive patients receiving immunotherapy against allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol.* 1991;88:199-208.

38. Malling HJ. Immunotherapy in Europe. *Clin Exp Allergy* 1994;24:515-521.
39. Van Bever HP, Vereecke IF, Bridts CH, de Clerck LS, Stevens WJ. Comparison between the in vitro cytokine production of mononuclear cells of young asthmatics with and without immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1998;28:943-949.
40. Ebner C, Sieman U, Bohle B, Willheim M, Wiedermann U, Schenk S, Klotz F, Ebner H, Kraft D, Scheiner O. Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from Th2 to Th1 in t-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen. *Clin Exp Allergy* 1997;27:1007-1015.
41. Varney V, Hamid QA, Gaga M, Ying S, Jacobson M, Frew AJ, Kay AB, Durham SR. Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen induced late phase cutaneous response. *KJ Clin Invest* 1993;92:664-665.
42. Secrist H, Chelen CJ, Wen Y, Marshall JD, Umetsu DT. Allergen immunotherapy decreases interleukin-4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 1993;178:2123-2130.
43. Hamid Q, Schotman E, Jacobson M, Walter S, Dirham S. Increases in interleukin-12 (IL-12) messenger RNA+ (mRNA+) cells accompany inhibition of allergen induced late skin responses following successful grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:254-260.
44. Creticos PS. The effects of immunotherapy on nasal mediators. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 1991;6:107-109.

45. Creticos PS, Adkinson N Jr, Kagey-Sobotka A, Proud D, Meier HL, Naclerio RM, Lichtenstein LM, Norman PS. Nasal challenge with ragweed pollen in hay fever patients. Effect of immunotherapy. *J Clin Invest* 1985;76:2247-2253.
46. Rak S, Lowhagen O, Venge P. The effect of immunotherapy on bronchial hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein in pollen-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1988;82:470-480.
47. Perelmutter L. IgE regulation during immunotherapy of allergic diseases. *Ann Allergy* 1986;57:78-85.
48. Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CR, Twentyman OP, Howarth RH, Howarth RH, Holgate ST. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:434-457.
49. Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1989;1:520-524.
50. Semper AE, Hartley JA. Dendritic cells in the lung: What is their relevance to asthma? *Clin Exp Allergy* 1996;26:485-490.
51. Holt PG, Schon-Hegrad MA, Phillips MJ, McMenemy PG. Ia-positive dendritic cells form a tightly meshed network within the human airway epithelium. *Clin Exp Allergy* 1989;19:597-601.
52. Schon-Hegrad MA, Oliver J, McMenemy PG, Holt PG. Studies on the density, distribution, an surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen (Ia)-bearing dendritic cells (DC) in the conducting airways. *J Exp Med* 1991;173:1345-1356.

53. Harding CV. Antigen processing: Approaches for dissecting subcellular mechanisms that form the basis for T-cell responses modulating allergic reactions. *Eur Respir J* 1996;9(Suppl 22):79-84.
54. Banchereau J, Steinman RH. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252.
55. Klein J, Sato A. The HLA system. *N Engl J Med* 2000;343:702-709.
56. Bellini A, Vittori E, Marini M, Ackerman V, Mattoli S. Intraepithelial dendritic cells and selective activation of Th2-like lymphocytes in patients with atopic asthma. *Chest* 1993;103:997-1005.
57. Feldmann M. Colaboración celular en la respuesta de anticuerpos. En: *Inmunología*. Roitt I, Brostoff J, Male D. Harcourt Brace de España. 1997;8.1-8.16.
58. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Effector mechanisms of immune responses. En: Abbas A, Lichtman A, Pober J, eds. *Cellular and molecular immunology*, 4<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Saunders, 2000;255-258.
59. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin M, Coffman RL. Two types of murine T helper cell clones. I. Definition according to profile of lymphokine activities. *J Immunol* 1986;136:2348-2357.
60. Yanagida M, Fukamachi H, Ohgami K, Kuwaki T, Ichii H, Uzumaki H, Amano K, Tokiwa T, Mitsui H, Saito H, Iikura Y, Ishizaka T, Nakuhata T. Effects of T helper 2-type cytokines, interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-5 and IL-6 on the survival of cultured human mast cells. *Blood* 1995;86:3705-3714.

61. Romagnani S. Induction of Th1 and Th2 responses: a key role for the “natural” immune response?. *Immunol Today* 1992;13:379-381.
62. Wierenga EA, Snoek M, de Groot C, Chretien I, Bos JD, Jansen HM, Kapsenberg ML. Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD2+ T lymphocytes in atopic patients. *J Immunol* 1990;144:4651-4656.
63. Kelso A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost?. *Immunol Today*. 1995;16:374-379.
64. O'Garra A, Murphy K. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Curr Opin Immunol*. 1994;6:458-466.
65. Vercelli D, Tabara HH, Lauener RP, Geha RS. IL-4 inhibits the synthesis of INF- $\gamma$  and induces the synthesis of IgE in human mixed lymphocyte cultures. *J Immunol* 1990;144:570-573.
66. Anderson GP, Coyle AJ. Th2 and “TH2-like” cells in allergy and asthma: pharmacological properties. *Trends Pharmacol Sci* 1994;15:324-332.
67. Gerblich AA, Salik H, Schuyler MR. Dynamic T-cell changes in peripheral blood and bronchoalveolar lavage after antigen bronchoprovocation in asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:533-537.
68. Wilson JW, Djukanovic R, Howarth PH, Holgate ST. Lymphocyte activation in bronchoalveolar lavage and peripheral blood in atopic asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992;145(4 pt 1):958-960.
69. Corrigan CJ, Hartnel A, Kay AB. T lymphocyte activation in acute severe asthma. *Lancet* 1988;21:1129-1131.



70. Corrigan CJ, Hamid Q, North J, Barkans J, Moqbel R, Durham S, Gemou-Engesaeth V, Kay AB. Peripheral blood CD4, but not CD8 T lymphocytes in patients with exacerbation of asthma transcribe and translate messenger RNA encoding cytokines which prolong eosinophil survival in the context of a Th2-type pattern: effect of glucocorticoid therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:567-578.
71. Robinson DS, Ying S, Bentley AM, Meng Q, North J, Durham SR, Kay AB, Hamid Q. Relationships among numbers of bronchoalveolar lavage cells expressing messenger ribonucleic acid for cytokines, asthma symptoms, and airways methacholine responsiveness in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:397-403.
72. Humbert M, Durham SR, Ying S, Kimmitt P, Barkans J, Assoufi B, Pfister R, Menz G, Robinsin DS, Kay AB, Corrigan CJ. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from atopic and non-atopic asthmatics: evidence against “intrinsic” asthma being a distinct immunopathological entity. *Am J Resp Crit Care Med* 1996;154:1497-1504.
73. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*. 1992;326:298-304.
74. Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal fetal interface. *J Immunol* 1993;151:4562-4573.
75. Cadet P, Rady PL, Tying SK, Yandell RB, Hughes TK. Interleukin 10 messenger ribonucleic acid in human placenta: implications of a role for interleukin 10 in fetal allograft protection. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:25-29.
76. Jones AC, Miles EA, Warner JO, Colwell BM. Fetal peripheral blood mononuclear cell proliferative responses to mitogenic stimulants during pregnancy. *Pediatr Allergy Immunol* 1996;7:109-116.

77. Egan RW, Umland SP, Cuss FM, Chapman RW. Biology of interleukin-5 and its relevance to allergic disease. *Allergy* 1996;51:71-81.
78. Denburg JA. The inflammatory response. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:511-513.
79. Wardlaw AJ, Moqbel R, Kay AB. Eosinophils: biology and role in disease. *Adv Immunol* 1996;60:151-266.
80. Hamid Q, Azzawi M, Ying S, Moqbel R, Wardlaw AJ, Corrigan CJ, Bradley B, Durham SR, Collins JV, Jeffery PK. Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. *J Clin Invest* 1991;87:1541-1546.
81. Virchow JC Jr, Walker C, Hafner D, Kortsik C, Webner P, Matthys H, Kraegel C. T cells and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Am J Resp Crit Care Med* 1995;151:960-968.
82. Robinson DS, Hamid Q, Bentley AM, Ying S, Kay AB, Durham SR. Cd4+ T cell activation, eosinophil recruitment and interleukin-4 (IL-4), IL-5 and GM-CSF messenger RNA expression in bronchoalveolar lavage after allergen challenge in atopic asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:313-324.
83. Wooley KL, Gibson PG, Carty K, Wilson AJ, Twaddell SH, Wooley MJ. Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. *AM J Respir Crit Care Med* 1996;154:237-243.
84. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefy R, de Vries JE. Interleukin 13 induces interleukin 4 independent IgG4 and IgE

synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3730-3734.

85. Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Spriger TA. Monocyte chemoattractant protein-1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3652-3656.

86. Raeburn D, Webber SE. Proinflammatory potential of the airway epithelium in bronchial asthma. *Eur Respir J* 1994;7:2226-2233.

87. Marini M, Soloperto M, Mezzeti M, Mattoli S. Interleukin-1 binds to specific receptors of human bronchial epithelial cells and upregulates granulocyte/macrophage colony-stimulating factor synthesis and release. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991;4:519-524.

88. Bradding P, Redington AE, Djukanovic R, Conrad DJ, Holgate ST. 15-Lipoxygenase immunoreactivity in normal and asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1201-1204.

89. Broide D, Firestein GS. Endobronchial allergen challenge in asthma. *J Clin Invest* 1991;88:1048-1053.

90. Monteseirín J, Camacho MJ, Montaña R, Llamas E, Conde M, Carballo M, Guardia P, Conde J, Sobrino F. Enhancement of antigen-specific functional responses by neutrophils from allergic patients. *J Exp. Med* 1996;183: 2571-2579.

91. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1989;320:271-277.

92. Geha RS. Regulation of IgE synthesis in humans. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:143-150.

93. 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;172:1861-1864.
94. Vercelli D, Geha RS. Regulation of IgE synthesis in humans: A tale of two signals. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:285-295.
95. Shapira SK, Vercelli D, Jabara HH, Fu SM, Geha RS. Molecular analysis of the induction of IgE synthesis in human B cells induced by interleukin-4 and engagement of CD40 antigen. *J Exp Med* 1992;175:289-292.
96. Gauchat JF, Lebman DA, Coffman RL, Gascan H, deVries JE. Structure and expression of germline E transcripts in human B-cells induced by interleukin-4 to switch to IgE production. *J Exp Med* 1990;172:463-473.
97. Tomioka M, Ida S, Shindoh Y, Ishihara T, Takishima T. Mast cells in bronchoalveolar lumen of patients with bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis* 1984;129:1000-1005.
98. Metzger WJ, Richerson HB, Worden K, Monick M, Hunninghake GW. Bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic patients following allergen provocation. *Chest* 1986;89: 477-483.
99. Humbert M, Grant JA, Taborda-Barata L, Durham SR, Pfister R, Menz G, Barkans J, Ying S, Kay AB. High affinity IgE receptor (FcεRI)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and non-atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1931-1937.
100. Ravetch JV, Kinet JP. Fc receptors. *Ann Rev Immunol* 1991;9:457-492.

101. De Monchy JG, Keyzer JJ, Kauffman Hf, Beaumont F, de Vries K. Histamine in late asthmatic reactions following house dust mite inhalation. *Agents Actions* 1985; 16: 252-255.
102. Bradding P, Feather IH, Wilson S, Barding PG, Heusser CH, Holgate ST, Howarth PH. Immunolocalisation of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects: the mast cell as a source of IL-4, IL-5 and IL-6 in human allergic mucosal inflammation. *J Immunol* 1993;151:3853-3865.
103. Okayama Y, Petit-Frere C, Kassel O, Semper A, Quint D, Tunon-de-Lara MJ, Bradding P, Holgate ST, Church MK. IgE-dependent expression of mRNA for IL-4 and IL-5 in human lung mast cells. *J Immunol* 1995;155:1796-1808.
104. Woodmar L, Filipowick A, Heusser CH, Moroni C. Production of the haemopoietic growth factor GM-CSF and Interleukin-3 by mast cell stimulated with IgE and antigens express multiple cytokines. *J Exp Med* 1989;170:240-257.
105. Bud PR, Roger HW, Gordon JR. Interleukin-3 dependent and independent mast cell stimulates with IgE and antigens express multiple cytokines. *J Exp Med* 1989;170:245-257.
106. 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.
107. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedts S, Simony-Lafontaine J, Godard P. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 1990 ;323:1033-1039.
108. Ohnishi T, Kita H, Weiller D, Sur S, Sedgwich JB, Calhoun WJ, Busse WW, Abrams S, Gleich GJ. IL-5 is the predominant eosinophil-active cytokine in the antigen-induced pulmonary late-phase reaction. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:901-907.

109. Aalbers R, Kauffmaan HF, Vrugt B, Smith M, Koëter GH, Timens W, De Monchi JGR. Bronchial lavage and bronchoalveolar lavage in allergen-induced single early and dual asthmatic responders. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:76-81.
110. Louis R, Shute J, Biangi S, Stanciu L, Marrelli F, Tenor H, Hidi R, Djukanovic R. Cell infiltration, ICAM-1 expression, and eosinophil chemotactic activity in asthmatic sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:466-472.
111. Beasley R, Roche WR, Roberts JA, Holgate ST. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:806-817.
112. Canonica GW. Role of adhesion molecules in the pathophysiology of Allergy. *ACI news* 1994;6(Suppl 3):8-10.
113. Campbell JJ, Butcher EC. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 2000;12:336-341.
114. Von Adrian UH, McKay IR. T cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 343:1020-1034.
115. Teran LM, Davies DE. The chemokines: their potential role in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* 1996;26:1005-1019.
116. Bryant DH, Burns MW. The relationship between bronchial histamine reactivity and atopic status. *Clin Allergy* 1976;6:373-381.
117. Gleich GJ. Eosinophil granule proteins and bronchial asthma. *Allergol Int* 1996;45:35-44.

118. Frigas F, Loegering DA, Gleich GJ. Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. *Lab Invest* 1980;42:35-43.
119. Ayars GH, Altman LC, McManus MM, Agosti JM, Baker C, Luchtel DL, Loegering DA, Gleich GJ. Injurious effect of the eosinophil peroxidase-hydrogen peroxide-halide system and major basic protein on human nasal epithelium in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:125-131.
120. Montefort S, Roberts JA, Beasley CR, Holgate ST, Roche WR. The site of disruption of the bronchial epithelium in asthmatics and non asthmatics. *Thorax* 1992;47:499-503.
121. Montefort S, Herbert CA, Robinson C, Holgate ST. The bronchial epithelium as a target for inflammatory attack. *Clin Exp Allergy* 1992;22:511-520.
122. Cho SH, Seo JY, Choi DC, Yoon HJ, Cho JY, Min KU, Lee GK, Sea JW, Kim YY. Pathological changes according to the severity of asthma. *Clin Exp Allergy* 1996;26:1210-1219.
123. Brewster CEP, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;3:507-511.
124. Laitinen LA, Laitinen A. Modulation of bronchial inflammation: corticosteroids and other therapeutic agents. *Am Rev Respir Crit Care Med* 1994;10:87-90.
125. Wilson JW, Li X, Pain MC. The lack of distensibility of asthmatic airways. *Am Rev Respir Dis* 1993;148: 806-809.

126. Kroegel C, Matthys H. Platelet-activating factor-induced human eosinophil activation: generation and release of cyclooxygenase metabolites in human blood eosinophils from asthmatics. *Immunology* 1993;78:279-285.
127. Lee TC, Lenihan DJ, Malone B, Ruddy LL, Wasserman SI. Increased biosynthesis of platelet activating factor by normal and low density human eosinophils. *J Biol Chem* 1984;259:5520-5530.
128. Nonaka M, Nonaka R, Woolley K, Adelloth E, Miura K, Okhawara Y, Glibetic M, Nakano K, O'Byrne P, Dolovich J. Distinct immunohistochemical localization of IL-4 in human inflamed airway tissues. IL-4 is localized to eosinophils in vivo and is released by peripheral blood eosinophils. *J Immunol.* 1995;155:3234-3244.
129. Moqbel R, Ying S, Barkans J, Newman TM, Kimmitt P, Wakelin M, Taborda-Barata L, Meng Q, Corrigan CJ, Durham SR, Kay AB. Identification of mRNA for interleukin-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. *J Immunol* 1995;155:4939-4947.
130. Levi-Schaffer F, Lacey P, Severs NJ, Newman TM, North J, Gomperts B, Kau AB, Moqbel R. Association of granulocyte macrophage colony-stimulating factor with the crystalloid granules of human eosinophils. *Blood* 1995;85:2579-2586.
131. Badorrey I, Izquierdo J, Morera J. *Diccionario EPOC y asma*. Barcelona: Temis Pharma, 2000;208-212.
132. Mark CL, Walker C, Hubbard D, Becki A, Stealy J, Galli A, Eugene R, Lawrence ML. Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:51-58.
133. Kay AB. Asthma and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:893-910.



134. Evans DJ, Lindsay MA, O'Connor BJ, Barnes PG. Priming of circulating human eosinophils following late response to allergen challenge. *Eur Respir J* 1996;9:703-708.
135. Pilewski JM, Albelda SM. Cell adhesion molecules in asthma: homing activation and airway remodelling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:1-3.
136. Montefort S, Gratziau C, Goulding D, Polosa R, Haskard DO, Howarth PH, Holgate ST, Carroll MP. Bronchial biopsy evidence for leucocyte infiltration and upregulation of leucocyte endothelial cell adhesion molecules 6 hours after local allergen challenge of sensitised asthmatic airway. *J Clin Invest* 1994;93:1411-1421.
137. Peat JK, Woolcock AJ, Cullen K. Rate of decline of lung function in subjects with asthma. *Eur J Respir Dis* 1987;70:171-179.
138. O'Connor GT, Sparrow D, Weiss ST. The role of allergy and nonspecific airway hyperresponsiveness in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:225-252.
139. Morgan RA, Ruscetti FW, Gallo RC. Selective in vitro growth of T lymphocytes. *Science* 1976;193:1007-1008.
140. Buendía García E. *Inmunología*. Luzan 5, SA, 1991:229-252.
141. Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T. The IL-2 receptor. *Immunology* 1993;11:245-268.
142. Theze J, Alzari PM, Bertoglio J. Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunol Today* 1996;17:481-486.

143. Brandhuber BJ, Boone T, Kenney WC, McKay DB. Three-dimensional structure of interleukin-2. *Science* 1987;238:1707-1709.
144. Cantrell DA, Smith KS. Transient expression of interleukin receptors. *J Exp Med* 1983;158:1895-1911.
145. Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 1988;240:1169-1176.
146. Leonard WJ, Depper JM, Uchiyama T, Smith KA, Waldmann TA, Greene WC. A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human-T growth factor: partial characterization of the receptor. *Nature* 1982;300:267-269.
147. Takeshita T, Asao H, Ohtani K, Ishii N, Kumaki S, Tanaka N, Munakata H, Nukumara M, Sugamura K. Cloning of  $\gamma$ -chain of the human IL-2 receptor. *Science* 1992;257:379-382.
148. Borish L, Rosenwasser LJ. Update on cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:719-734.
149. Noguchi M, Yi H, Rosenblatt HM, Filipovich AH, Adelstein S, Modi WS, McBride OW, Leonard WJ. Interleukin-2 receptor  $\gamma$  chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 1993;73:147-157.
150. Teshigawara K, Wang HM, Kato K, Smith KA. Interleukin-2 high-affinity receptor expression requires two distinct binding proteins. *J Exp Med* 1987;165:223-238.
151. Harel-Bellan A, Mishal Z, Willette-Brown J, Farrar WL. Detection of low and high affinity binding sites with fluoresceinated human recombinant interleukin-2. *J Immunol Methods* 1989;119:127-133.

152. Rubin LA, Kurman CC, Fritz ME, Biddison WE, Boutin B, Yarchoan R, Nelson DL. Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. *J Immunol* 1985;135:3172-3177.
153. Rubin LA, Jay G, Nelson DL. The released interleukin 2 receptor binds interleukin 2 efficiently. *J Immunol* 1986;137:3841-3844.
154. Miedel MC, Hulmes JD, Weber DV, Bailon P, Pan YC. Structural analysis of recombinant soluble interleukin-2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;154:372-379.
155. Rubin LA, Nelson DL. The soluble interleukin-2 receptor: biology, function, and clinical application. *Ann Int Med* 1990;113:619-627.
156. Lai KN, Leung JCK, Lai FM. Soluble interleukin 2 receptor release, interleukin 2 production, and interleukin 2 receptor expression in activated T lymphocytes in vitro. *Pathology* 1991;23:224-228.
157. Kniep EM, Strelow I, Lohmann-Matthes ML. The monocyte interleukin-2 receptor light chain: production of cell-associated and soluble interleukin-2 receptor by monocytes. *Immunology* 1992;75:299-304.
158. Saiki O, Tanaka T, Doi S, Kishimoto S. Expression and functional role of a p70/75 interleukin-2 binding molecule in human B cell. *J Immunol* 1988;140:853-858.
159. Kehri JH, Dukovich M, Whalen G, Katz P, Fauci AS, Greene W. Novel interleukin 2 (IL-2) receptor appears to mediate IL-2 induced activation of natural killers cells. *J Clin Invest* 1988;81:200-205.
160. Rand TH, Silberstein DS, Kornfeld H, Weller PF. Human eosinophils express functional interleukin 2 receptors. *J Clin Invest* 1991;88:825-833.

161. Motojima S, Hirata A, Kushima A, Taeishi K, Numao T, Fukuda T, Makino S. Serum levels of soluble interleukin-2 receptor in asthma patients. *J Asthma* 1995;32:151-158.
162. Nelson DL, Rubin LA, Kurgan CC, Fritz ME, Boutin B. An análisis of the cellular requirements for the production of soluble interleukin-2 receptor in vitro. *J Clin Immunol* 1986;6:114-117.
163. Reske-Kunz AB, Osawa H, Josimoviv-Alesevic O, Rude E, Diamantstein T. Soluble IL-2 receptors are released by long-term cultured insulin-especific T cells transiently alter contact with antigen. *J Immunol* 1987;138:192-196.
164. Gooding R, Riches P, Dadian G, Moore J, Gore M. Increased soluble interleukin-2 receptor concentration in plasma predicts a decreased cellular response to IL-2. *Br J Cancer* 1995;72:452-455.
165. Ginns LC, De Hoyos A, Brown MC, Gaumond BR. Elevated concentration of soluble interleukin-2 receptors in serum of smokers and patiens with lung cancer. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:398-402.
166. Tollerud DJ, Weiss ST, Leung DY. Elevated soluble interleukin-2 receptors in young healthy cigarette smokers: lack of a association with atopy or airways pyperresponsiveness. *Int Arch Allergy Immunol* 1992;97:25-30.
167. Tilz GP, Domej W, Diez-Ruiz A, Weiss G, Brezinschek R, Brezinschek HP. Increased immune activation during and after physical exercise. *Immunobiology* 1993;188:194-202.
168. Komp DM, Shapiro E, McNamara J. Soluble IL-2 receptor in childhood non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1988;71:1172-1174.

169. Lal RB, Rudolph DL, Roberts CH, Honda M. Elevated levels of soluble CD8 and CD25 in patients with Human T Cell Leukemia Virus Type I-II associated myelopathy and adult T Cell Leukemia. *J Infect Dis* 1991;164:429-430.
170. Steis RG, Marcon L, Clark J, Urba W, Longo DL, Nelson DL, Malvish AE. Serum soluble IL-2R receptors as a tumor marker in patients with hairy cell leukemia. *Blood* 1988;71:1304-1309.
171. Motoi T, Uchiyama T, Hori T, Itoh K, Uchino H, Ueda R. Elevated serum soluble interleukin-receptor (Tac antigen) levels in chronic myelogenous leukemia patients with blastic crisis. *Blood* 1989;74:1052-1057.
172. Cimino G, Amadori S, Cava MC, De Sanctis V, Petti MC, Di Gregorio AO, Sgadari C, Vegna L, Mandelli F. Serum Interleukin-2 (IL-2), soluble interleukin-2 receptors and tumor necrosis factor- $\alpha$  levels are significantly increased in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 1991;5:32-35.
173. Pizzolo G, Chilosi M, Vinante F, Dazzi F, Lestani M, Perona G, Benedetti F, Todeschini G, Vincenzi C, Trentin L. Soluble interleukin-2 receptors in the serum of patients with Hodgkin's disease. *Br J Cancer* 1987;55:427-428.
174. Pui CH, Ip SH, Kung P, Dodge RK, Berard CW, Crist WM, Murphy SB. High serum interleukin-2 receptor levels are related to advanced disease and poor outcome in childhood non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* 1987;70:624-628.
175. Pavlidis NA, Bairaktari E, Kalef-Ezra J, Nicolaidis C, Ceferiadis C, Fountzilas G. Serum soluble interleukin-2 receptors in epithelial ovarian cancer patients. *Int J Biol Markers* 1995;10:75-80.

176. Rovelli F, Lissoni P, Crispino S, Barni S, Fumagalli G, Paolorossi F, Tancini G. Increased levels of soluble interleukin-2 receptor in advanced solid tumors: a preliminary study. *Tumori* 1988;74:633-637.
177. Fierro MT, Lisa F, Novelli M, Bertero M, Bernengo MG. Soluble interleukin-2 receptor, CD4 and CD8 levels in Melanoma: a longitudinal study. *Dermatology* 1992;184:182-189.
178. Wasik MA, Vonderheid EC, Bigler RD, Marti R, Lessin SR, Polansky M, Kadin ME. Increased serum concentration of soluble interleukin-2 receptor in cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol* 1996;132:42-47.
179. Szeimies RM, Rueff F, Kaudewitz P. Soluble interleukin-2 receptor serum levels in mycosis fungoides. Correlation with clinical stage. *Cancer* 1992;90:2238-2241.
180. Lipnick RN, Sfikakis PP, Klipple GL, Tsokos GC. Elevated soluble CD8 antigen and soluble interleukin-2 receptors in the sera of patients with Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1993;68:64-67.
181. Miossec P, Elhamiani M, Edmonds-Alt X, Sany J, Hirn M. Functional studies of soluble low-affinity interleukin-2 receptors in rheumatoid synovial fluid. *Arthritis Rheum* 1990;33:1688-1694.
182. Swaak AJ, Hintzen RQ, Huysen V, van den Brink HG, Smeenk JT. Serum levels of soluble forms of T cell activation antigens CD27 and CD25 in systemic lupus erythematosus in relation with lymphocytes count and disease course. *Clin Rheumatol* 1995;14:293-300.
183. Degiannis D, Seibold JR, Czarnecki M, Raskova J, Raska K. Soluble interleukin-2 receptors in patients with systemic sclerosis. Clinical and laboratory correlations. *Arthritis Rheum* 1990;33:375-380.

184. Wolf RE, Baethge BA. Cytokines and interleukin-2 receptors in polymyositis. *Arthritis Rheum* 1989;32:31.
185. Lang BA, Silverman ED, Laxer RM, Rose V, Nelson DL, Rubin LA. Serum-soluble interleukin-2 receptor levels in Kawasaki disease. *J Pediatr* 1990;116:592-596.
186. Peter JB, Boctor FN, Wallace A, Tourtellotte W. Serum and CSF levels of IL-2, sIL-2R, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  in chronic progressive multiple sclerosis: expected lack of clinical utility. *Neurology* 1991;41:121-123.
187. Giordano C, Galluzzo A, Marco A, Panto F, Amato PM, Caruso C, Bompiani GD. Increased soluble interleukin-2 receptor levels in the sera of type I diabetic patients. *Diabetes Res* 1988;8:135-138.
188. Crabtree JE, Juby LD, Heatly RV, Lobo AJ, Bullimore DW, Axon AT. Soluble interleukin-2 receptor in Crohn's disease: relation of serum concentrations to disease activity. *Gut* 1990;31:1033-1036.
189. Aiello A, Cristofaro M, Carrozza F, Verdone F, Carile L. Lymphocyte subpopulations and the soluble interleukin-2 receptor in Hashimoto's thyroiditis and subacute thyroiditis. *Clin Ter* 1990;133:401-404.
190. Bansil S, Mithen FA, Cook SD, Sheffet A, Rohowsky-Kochan C. Clinical correlation with serum-soluble interleukin-2 receptor levels in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 1991;41:1302-1305.
191. Penedo-Pita M, Peteiro-Cartelle J. Increased serum levels of interleukin-2 and soluble interleukin-2 receptor in Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991;12:56-60.

192. Takematsu IH, Tagami H. Interleukin-2, soluble interleukin 2 receptor, and interferon- $\gamma$  in the suction blister fluids from psoriatic skin. *Arch Dermatol Res* 1990;283:149-152.
193. Chu CM, Liaw YF. Serum levels of soluble Tac peptide in acute and chronic hepatitis B virus infection. *Clin Immunol Immunopathol* 1989;53:52-58.
194. Prince HE, Kleimanman S, Williams AE. Soluble IL-2 Receptor levels in serum from blood donors seropositive for HIV. *J Immunol* 1988;140:1139-1141.
195. Honda M, Kitamura K, Matsuda K, Tokota Y, Yamamoto N, Mitsuyasu R, Chermann JC, Tokunaga T. Soluble IL-2 receptor in AIDS. Correlation of its serum level with the classification of HIV-induced diseases and its characterization. *J Immunol* 1989;142:4248-4255.
196. Pizzolo G, Chilosi S, Semenzato G. The soluble interleukin-2 receptor in haematological disorders. *Br J Haematol* 1987;67:377-380.
197. Griffin DE, Ward BJ, Jauregui E, Johnson RT, Vaisberg A. Immune activation in measles. *N Engl J Med* 1989; 32:1667-1672.
198. Tung KS, Umland E, Matzner P, Nelson K, Schauf V, Rubin L, Wagner D, Scollard D, Vithayasai P, Vithayasai V. Soluble serum interleukin 2 receptor levels in leprosy patients. *Clin Exp Immunol* 1987;69:10-15.
199. Chan CH, Lai KN, Leung JC, Lai CK.. T lymphocyte activation in patients with active tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:458-460.
200. Deloron P, Lepers JP, Coulanges P. Evolution of the levels of soluble interleukin-2 receptor during *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria. *J Clin Microbiol* 1989;27:1887-1889.



201. Cornaby A, Simpson MA, Rice RV, Dempsey RA, Madras PN, Monaco AP. Interleukin-2 receptor levels and urine cytology as a mean of monitoring renal allograft recipients. *Transplantation Proc* 1988;20:108-110.
202. Lawrence EC, Holland VA, Young JB, Windsor NT, Brousseau KP, Noon GP, Whisennand HH, Debakey ME, Nelson DL. Dynamic changes in soluble interleukin-2 receptor levels after lung or heart-lung transplantation. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:789-796.
203. Adams DH, Wang L, Hubscher SG, Elias E, Neuberger JM. Soluble interleukin-2 receptors in serum and bile of liver transplant recipients. *Lancet* 1989;1:469-1471.
204. Ohashi Y, Nakai Y, Tanaka A, Kakinoki Y, Ohno Y, Masamoto T, Sakamoto H, Kato A, Washio Y, Hayashi M. Serum levels of specific IgE, soluble interleukin-2 receptor, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in seasonal allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1997;79:213-220.
205. Uchio E, Ono S, Ikezawa Z. Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and interleukin-2 receptor in patients with vernal keratoconjunctivitis and allergic conjunctivitis. *Allergy* 1999;54:135-141.
206. Pforte A, Brunner A, Gais P, Strobel M, Burger G, Breyer G, Haussinger K, Ziegler-Heitbrock L. Increased levels of soluble serum interleukin-2 receptor in extrinsic allergic alveolitis correlate with interleukin-2 receptor expression on alveolar macrophages. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94(6 Pt 1):1057-1064..
207. Brown JE, Greenberger PA, Yarnold PR. Soluble serum interleukin 2 receptors in patients with asthma and allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995;74:484-488.

208. Sauer J, Rupprecht M, Arzt E, Stalla GK, Rupprecht R. Glucocorticoids modulate soluble interleukin-2 receptor levels in vivo depending on the state of immune activation and the duration of glucocorticoid exposure. *Immunopharmacology* 1993;25:269-276.
209. Kagi MK, Joller-Jemelka H, Wuthrich B. Correlation of eosinophils, eosinophil cationic protein and soluble interleukin-2 receptor with the clinical activity of atopic dermatitis. *Dermatology* 1992;185:82-92.
210. Colver GB, Symons JA, Duff GW. Soluble interleukin 2 receptor in atopic eczema. *BMJ* 1989;298:1426-1428.
211. Teodorczyk-Injeyan JA, Sparkes GB, Mills GB, Falk RE, Peters WJ. Increase of serum interleukin 2 receptor in thermally injured patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1989;51:205-215.
212. Descamps-Latscha B, Herbelin A, Nguyen AT, Roux-Lombard P, Zyngraff J, Moynot A, Verger C, Dahmane D, de Groote D, Jungers P. Balance between IL-1 beta, TNF-alpha, and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis. Relationship with activation markers of T cells, B cells, and monocytes. *J Immunol* 1995;154:882-892.
213. Semenzato G, Cipriani A, Trentin L, Zambello R, Masciarelli M, Vinante F, Chilosi M, Pizzolo G. High serum levels of soluble interleukin-2 receptors in sarcoidosis. *Sarcoidosis* 1987;4:25-27.
214. Gaughran F, O'Neill E, Cole M, Collins K, Daly RJ, Shanahan F. Increased soluble interleukin 2 receptor levels in schizophrenia. *Schizophr Res* 1998;29:263-267.
215. Maes M, Bosmans E, Suy E, Vandervorst C, Dejonckheere C, Raus J. Antiphospholipid, antinuclear, Epstein-Barr and cytomegalovirus antibodies, and soluble interleukin-2 receptors in depressive patients. *J Affect Disord* 1991;21:133-140.

216. Wagner F, Assemi C, Lersch C, Hart R, Classen M. Soluble interleukin-2 receptor and soluble CD8 in liver cirrhosis and obstructive jaundice. *Clin Exp Immunol* 1990;82:344-349.
217. Limas CJ, Goldenberg IF, Limas C. Soluble interleukin-2 receptor levels in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1995;91:631-634.
218. Hsieh KH. Decreased production of interleukin-2 receptors after immunotherapy to house dust. *J Clin Immunol* 1988;8:171-177.
219. Reich M, Zwacka G, Markert UR. Nonspecific plasma proteins during sublingual immunotherapy. *Chem Immunol Allergy* 2003;82:99-108.
220. Park HS, Nahm DH, Kim HY, Suh YJ, Cho JW, Kim SS, Lee SK, Jung KS. Clinical and immunologic changes after allergen immunotherapy with Hop Japanese pollen. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;86:444-448.
221. Moens MM, Van Bever HP, Stevens WJ, Mertens AV, Bridts CH, De Clerck LS. Influence of hyposensitization on soluble interleukin-2 receptor, eosinophil cationic protein, in vitro lymphocyte proliferation, in childhood asthma. *Allergy* 1994;49:653-658.
222. Grammer LC, Shaughnessy MA, Kabalin CS, Yarnold PR, Malo JL, Cartier A. Immunologic aspects of isocyanate asthma: IL-1 beta, IL-3, IL-4, sIL2R, and sICAM-1. *Allergy Asthma Proc* 1998;19:301-305.
223. Schmitt M, Niggemann B, Kleinau I, Nasert S, Kapp A, Wahn U. Lymphocyte subsets, sIL2-R and sICAM-1 in blood during allergen challenge tests in asthmatic children. *Pediatr Allergy Immunol* 1993;4:208-213.

224. Van Bever HP, Moens MM, Bridts CH, De Clerck LS, Mertens AV, Bosmans E, Stevens WJ. Effect of a bronchial provocation test with house-dust mite on blood eosinophilia, eosinophil cationic protein, soluble interleukin-2 receptor, and interleukin-6 in asthmatic children. *Allergy* 1993;48:443-449.
225. American Toracic Society. Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:1202-1218.
226. Brown HM, Su S, Thantrey N. Prick testing for allergens standardized by using a precision needle. *Clin Allergy* 1981;11:95-98.
227. Bousquet J, Chanez P, Chanal I, Michel FB. Comparison between RAST and Pharmacia CAP system: a new automated specific IgE assay. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:1039-1043.
228. American Toracic Society. Lung function testing: selection of reference values using techniques and equipment that meet A.T.S. recommendations. *Am Rev Respir Dis* 1981; 19(Suppl 5):1-95.
229. Crapo RO, Morris AH, Gardner RM. Reference spirometric values using techniques and equipment that meet ATS recomendations. *Am Rev Respir Dis* 1981;123:659-664.
230. Quanjer PH. Standardized lung function testing. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1983;19 (Suppl 5):1-95.
231. Prieto L, Marín J. Metodología del test de provocación bronquial con metacolina. I. Repetibilidad, definición de los puntos de corte y métodos para calcular los resultados. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 1991;6:103-111.

232. Ramsdale EH, Morris MM, Roberts RS, Hargreave FE. Bronchial responsiveness to methacholine in chronic bronchitis: relationship to airflow obstruction and cold air responsiveness. *Thorax* 1984;39:912-918.
233. Prieto JL. Aspectos técnicos de la prueba de provocación bronquial con agentes farmacológicos. En: Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica, ed. Pruebas de provocación bronquial inespecíficas y específicas. Madrid: Edicomplet, 1993;33-70.
234. Chai. H. Bronchial challenges. *Clin Rev Allergy* 1988;6:231-258.
235. Armitage P, Berry G. Estadística para la investigación biomédica. Barcelona: Ediciones Doyma S.A, 1992.
236. Pardell H, Cobo E, Canela J. Manual de Bioestadística. Barcelona: Ed Masson S.A, 1986.
237. Mathews DE, Farewell VT. Estadística médica. Aplicación e interpretación. 2ª edición. Barcelona: Editorial Salvat, 1990.
238. Carrasco de la Peña JR. El método estadístico en la investigación biomédica. 3ª edición. Madrid: Editorial Ciencia 3 S.A, 1987.
239. Colton T. Estadística en medicina. Barcelona: Ed Salvat S.A, 1979.
240. Sharon N, Lis H. Lectins: cell agglutinating and sugar specific proteins. *Science* 1972;177:949-956.
241. 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;15:479-485.

242. 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;15:851-857.
243. 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;313:686-691.
244. Walker C, Virchow JC Jr, Bruijnzeel PL, Blaser K. T cell subsets and their soluble products regulate eosinophilia in allergic and nonallergic asthma. *J Immunol* 1991;146:1829-1835.
245. Nabetani M, Yamasaki T, Kameda A, Okamoto O, Kishimoto T. Interleukin-2 receptor positive T and B cells in children with acute severe asthmatic attack. *Acta Paediatr Jpn* 1995;37:474-478.
246. Park CS, Lee SM, Uh ST, Kim HT, Chung YT, Kim YH, Choi BW, Hue SH. Soluble interleukin-2 receptor and cellular profiles in bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993;91:623-633.
247. Shi HZ, Sun JJ, Pan HL, Lu JQ, Zhang JL, Jiang JD. Alterations of T-lymphocyte subsets, soluble IL-2 receptor, and IgE in peripheral blood of children with acute asthma attacks. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103(3 Pt 1):388-394.
248. Corrigan CJ, Kay AB. CD4 T lymphocyte activation in acute severe asthma. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991;94:270-271.
249. Corrigan CJ, Kay AB. CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status. *Am Rev Respir Dis* 1990;141(4 Pt 1):970-977.

250. Park CS, Lee SM, Chung SW, Uh S, Kim HT, Kim YH. Interleukin-2 and soluble interleukin-2 receptor in bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchial asthma. *Chest* 1994;106:400-406.
251. Wang H, Sun B. Changes in serum eosinophil cation protein level and blood eosinophil density in patients with asthma. *Chung Hua Nei Ko Tsa Chih* 1995;34:802-804.
252. Shiota Y, Sato T, Ono T, Kaji M. Serum soluble CD23 and soluble CD25 in bronchial asthmatic patients. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1993;31:932-935.
253. Matsumoto K, Taki F, Miura M, Matsuzaki M, Takagi K. Serum levels of soluble IL-2R, IL-4, and soluble Fc  $\epsilon$  RII in adult bronchial asthma. *Chest* 1994;105:681-686.
254. Hashimoto S, Amemiya E, Tomita Y, Kobatashi T, Arai K, Yamaguchi M, Horie MD. Elevation of soluble IL-2 receptor and IL-4, and nonelevation of INF- $\gamma$  in sera from patients with allergic asthma. *Ann Allergy*. 1993;71:455-458.
255. Shiota Y, Sato T, Ono T. Serum levels of soluble CD25 (soluble interleukin 2 receptor) in asthmatic patients. *Arerugi* 1993;42:914-919.
256. Brown PH, Crompton GK, Greening AP. Proinflammatory cytokines in acute asthma. *Lancet* 1991;338:590-593.
257. Spahn JD, Leung DY, Surs W, Harbeck RJ, Nimmagadda S, Szeffler SJ. Reduced glucocorticoid binding affinity in asthma is related to ongoing allergic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1709-1714.
258. Belleguic C, Corbel M, Germain N, Lena H, Boichot E, Delaval PH, Lagente V. Increased release of matrix metalloproteinase-9 in the plasma of acute severe asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* 2002;32:217-223.

259. Tang RB, Chen SJ. Soluble interleukin-2 receptor and interleukin-4 in sera of asthmatic children before and after a prednisolone course. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;86:314-317.
260. Sahid EI-Radhi A, Hogg CL, Bungre JK, Bush A, Corrigan CJ. Effect of oral glucocorticoid treatment on serum inflammatory markers in acute asthma. *Arch Dis Child* 2000;83:158-162.
261. Li Q, Jiang B, Liu Z. Relationship between asthma and activated T-lymphocytes and interleukin-4. *Chung Hua Nei Ko Tsa Chih* 1997;36:102-104.
262. Motojima S, Ogata H, Tateishi K, Kushima A, Yamai T, Fukuda T, Makino S. Soluble interleukin-2 receptor in sputum from patients with bronchial asthma. *Alerugi* 1993;42:162-166.
263. Kim JT, Kim CK, Koh YY. Serum levels of soluble interleukin-2 receptor at acute asthma exacerbation:relationship with severity of exacerbation and bronchodilator response. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;117:263-269.
264. Schultz C, Bucsky P. Elevated soluble interleukin-2 receptor: a marker of T cell activation in children with acute asthma exacerbation?. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;120:245-246.
265. Lai CK, Chan CH, Leung JC, Lai KN. Serum concentration of soluble interleukin 2 receptors in asthma. Correlation with disease activity. *Chest* 1993;103:782-786.
266. Moens MM, Mertens AV, De Clerk LS, Van Bever HP, Bridts CH, Stevens WJ. Are hypodense eosinophils in children activated or immature?. *Pediatr Allergy Immunol* 1993;4:89-92.



267. Guarnaccia S, Kurman CC, Notarangelo LD, La Grutta S, Candotti F, Ugazio AG, Nelson DL, Bellanti JA. Serum soluble interleukin-2 receptor (IL-2R) in children with allergic disorders. *Ann Allergy* 1993;71:259-262.

268. Matsumoto T, Miike T, Yamaguchi K, Murakami M, Kawabe T, Yodoi J. Serum levels of soluble IL-2 receptor, IL-4 and IgE-binding factors in childhood allergic diseases. *Clin Exp Immunol* 1991;85:288-292.

269. Lanz MJ, Leung DY, McCormick DR, Harbeck R, Szeffler SJ, White CW. Comparison of exhaled nitric oxide, serum eosinophilic cationic protein, and soluble interleukin-2 receptor in exacerbations of pediatric asthma. *Pediatr Pulmonol* 1997;24:305-311.

270. Schauer U, Schmitt M, Muller S, Enssle K, Kurrle R, Sundermann U, Bender A. Soluble interleukin-4 receptor in atopic children. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;108:175-182.

271. Hoeger PH, Niggemann B, Ganschow R, Dammann C, Haeuser G. Serum levels of sCD23 and sCD25 in children with asthma and in healthy controls. *Allergy* 1994;49:217-221.

272. Frederick JM, Warner JO, Jessop WJ, Enander I, Warner JA. Effect of a bed covering system in children with asthma and house dust mite hypersensitivity. *Eur Respir J* 1997;10:361-366.

273. Ohashi Y, Nakai Y, Tanaka A, Kakinoki Y, Washio Y, Kato A, Masamoto T, Sakamoto H, Yamada K. Ten-year follow-up study of allergen-specific immunoglobulin E and immunoglobulin G4, soluble interleukin-2 receptor, interleukin-4, soluble intercellular adhesion molecule-1 and soluble vascular cell adhesion molecule-1 in serum of patients on immunotherapy for perennial allergic rhinitis. *Scand J Immunol* 1998;47:167-178.

274. Ohashi Y, Nakai Y, Sakamoto H, Ohno Y, Sugiura Y, Okamoto H, Tanaka A, Kakinoki Y, Kishimoto K, Hayashi M. Serum levels of soluble interleukin-2 receptor in patients with perennial allergic rhinitis before and after immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996;77:203-208.

275. Ohashi Y, Tanaka A, Kakinoki Y, Ohno Y, Sakamoto H, Kato A, Masamoto T, Wahio Y, Nakai Y. Serum level of soluble interleukin-2 receptor in patients with seasonal allergic rhinitis. *Scand J Immunol* 1997;45:315-321.

276. Upham JW, Holt BJ, Baron-Hay MJ, Yabuhara A, Hales BJ, Thomas WR, Loh RK, O'Keeffe PT, Palmer L, Le Sauef PN. Inhalant allergen-specific T-cell reactivity is detectable in close to 100% of atopic and normal individuals: covert responses are unmasked by serum-free medium. *Clin Exp Allergy* 1995;25:634-642.

277. Bonno M, Fujisawa T, Iguchi K, Uchida Y, Kamiya H, Komada Y, Sakurai M. Mite-specific induction of interleukin-2 receptor on T lymphocytes from children with mite-sensitive asthma: modified immune response with immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:680-688.

278. Hsieh KH. Study of immunological changes after hyposensitization in house dust sensitive asthmatic children. *Ann Allergy* 1982;48:25-33.

279. Hsieh KH. Changes of lymphoproliferative responses of T-cell subsets to allergen and mitogen after hyposensitization in asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol* 1984;74:33-40.

280. Gulberg M, Smith KA. Regulation of T cell autocrine growth. T4+ cells become refractory to interleukin 2. *J Exp Med* 1986;163:270-284.

281. Muñoz Lejarazu D, Bernaola G, Fernández E, Audicana M, Ventas P, Martín S, Fernández de Corres L. Seasonal versus perennial immunotherapy: evaluation after three years of treatment. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1993;3:210-216.
282. Ihre E, Axelsson GK, Zetterström O. Late asthmatic reactions and bronchial variability after challenge with low doses of allergen. *Clin Allergy* 1988;18:557-567.
283. Koh YY, Lim HS, Min KU, Min YG. Airways of allergic rhinitics are “primed” to repeated allergen inhalation challenge. *Clin exp Allergy* 1994;24:337-346.
284. Stelmach I, Jerzynska J, Kuna P. Markers of allergic inflammation in peripheral blood of children with asthma after treatment with inhaled triamcinolone acetonide. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;87:319-326.
285. Lassalle P, Sergant M, Delneste Y, Gosset P, Wallaert B, Zandecki M, Copron A, Joseph M, Tonnel AB. Levels of soluble IL-2 receptor in plasma from asthmatics. Correlations with blood eosinophilia, lung function, and corticosteroid therapy. *Clin Exp Immunol* 1992;87:266-271.
286. Van Bever H, Stevens W. Evolution of the late asthmatic reaction during immunotherapy and after stopping immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:141-146.
287. Warner J, Price J, Soothill J, Hey E. Controlled trial of hyposensitization to *Dermatophagoides pteronyssinus* in children with asthma. *Lancet* 1978;2:912-915.