



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Medicina

Modulació de la resposta immunològica per la immunoteràpia
amb *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Relació amb l'eficàcia clínica

Victòria Cardona i Dahl

Barcelona 2002

MERCÈ COROMINAS I SÀNCHEZ, Doctora en Medicina per la Universitat de Barcelona, i metge adjunt de la Unitat d'Al·lèrgia del Servei d'Immunologia de la Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge, i **JOSEP ÀNGEL BOSCH I GIL**, Professor Titular del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, i Cap Clínic del Servei de Medicina Interna de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron.

CERTIFIQUEN que la Tesi Doctoral titulada “**Modulació de la resposta immunològica per la immunoteràpia amb *Dermatophagoides pteronyssinus*. Relació amb l'eficàcia clínica**” realitzada per **VICTÒRIA CARDONA I DAHL**, té el contingut científic suficient i es troba en condicions per ser llegida davant el tribunal corresponent, a fi d'optar al grau de Doctor en Medicina .

Per tant, com a Directora i Tutor d'aquesta Tesi, signem el present certificat a Barcelona a 16 de setembre de 2002.



Dra. M. Corominas



Dr. J. A. Bosch

“If you have built castles in the air, your work need not be lost;
that is where they should be. Now put the foundations under them”

Henry David Thoreau

Dedicat als pares

Agraïments

Vull donar el meu sincer agraïment a tots els amics que m'han ajudat a elaborar aquest treball, ja que sense ells no ho hagués pogut fer:

A la Dra. Mercè Corominas, Metge Adjunt d'Al·lèrgologia de l'Hospital de Bellvitge, qui ha dirigit aquesta tesi. M'ha contagiats el seu entusiasme, fins i tot en els moments quan estava a punt d'abandonar el projecte. Mercè, ha sigut un plaer treballar amb tu.

Al Dr. Josep A. Bosch, Cap Clínic del Servei de Medicina Interna de l'Hospital Vall d'Hebron, i tutor d'aquesta tesi, per recolzar els projectes dels Al·lèrgòlegs del seu Servei.

Als meus pares, Margareta i Josep, que han tingut una paciència gairabé infinita, mentres anaven passant els mesos, i aquesta tesi encara no s'acabava. Sé que l'angoixa ha estat als vostres cors molts cops. Gràcies.

Al cap de la Secció d'Al·lèrgia de l'Hospital de la Vall d'Hebron, Álvaro Cadahía, el meu cap, ja que m'ha permès desenvolupar aquest projecte sense cap entrebanc. M'ha ajudat en tot moment, facilitant-me tots els mitjans per dur endavant el projecte.

Al Dr. Enric Buendia, Cap del Servei d'Immunologia, i a tot el seu equip, per permetrem integrar-me durant una temporada al seu grup de treball i fer-me sentir com a casa.

A tot els companys d'Al·lèrgologia de l'Hospital Vall d'Hebron, per ajudar-me sempre que els vaig necessitar, i especialment a les meves amigues Carmen Nogueiras, Mar Guilarte, Pilar Cots i M^a José Castillo.

Al Dr. Joan Caylà, Cap del Servei d'Epidemiologia del Institut Municipal de Salut Pública de Barcelona, per orientar-me en certs aspectes de l'anàlisi de les dades obtingudes.

A Elisa Vilas, infermera que amb la seva gran professionalitat em va ajudar a dur a terme les extraccions sanguínies.

Als amics que han hagut de sentir moltes vegades un "no" com a resposta a les seves propostes i invitacions, per que "havia de treballar en la tesi".

A la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica, als laboratoris CBF-Leti i ALK-Abelló, que amb el seu ajut a aquest projecte d'investigació, han permès la financiació d'aquesta tesi.

Abreviatures

AP-1	Proteïna activadora 1
BAL	Rentat bronco-alveolar
CD	Cluster differentiation
CD23	Receptor de baixa afinitat per a l'IgE o Fc _ε RII
CD23s	CD23 soluble
CMN	Cèl·lules mononuclears
CMSP	Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica
CPA	Cèl·lula presentadora d'antigen
ECP	Proteïna catiònica de l'eosinòfil
Fc _ε RI	Receptor d'alta afinitat per a l'IgE
Fc _ε RII	Receptor de baixa afinitat per a l'IgE o CD23
Fig.	Figura
FITC	Fluoro-isotiocianat
GATA-3	Zinc-finger transcription factor
GM-CSF	Factor estimulator de colònies de granulòcits i macròfags
HLA	Antigen leucocitari humà
I	Ionomicina
IFN	Interferó
Ig	Immunoglobulina
IL	Interleucina
kD	Kilodaltons
LT	Leucotrié
MCC	Medi de cultiu complet
MHC	Complex principal d'histocompatibilitat
μCi	Micro Curie
μg	Microgram
ml	Mililitre
NF-AT	Factor nuclear de cèl·lules T activades
NIP45	NF-AT-interacting protein 45
PAF	Factor activador de plaquetes
PE	Ficoeritrina
PerCP	Peridium chlorophyl protein

PG	Prostaglandina
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	Miesterat de forbol
RANTES	Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted
STAT	Transductor del senyal i activador de la transcripció
SRS-A	Substància de reacció lenta d'anafilaxi
TCR	Receptor de la cèl· lula T
TGF	Factor de creixement transformador
TNF	Factor de necrosi tumoral
U	Unitat
UI	Unitat internacional

Index

Agraïments	7
Abreviatures	9
1 INTRODUCCIÓ	17
1.1 REACCIONS D'HIPERSENSIBILITAT	17
1.2 LA REACCIÓ AL·LÈRGICA	19
1.2.1 AL·LERGEN	21
1.2.2 IMMUNOGLOBULINA E	22
1.2.2.1 ESTRUCTURA DE LA IMMUNOGLOBULINA E	23
1.2.2.2 RECEPTORS DE LA IMMUNOGLOBULINA E	25
1.2.2.2.1 Receptor d'alta afinitat de la immunoglobulina E (FcεRI)	25
1.2.2.2.2 Receptor de baixa afinitat de la immunoglobulina E (FcεRII)	27
1.2.2.3 FUNCIONS DE LA IgE	30
1.2.3 RESPOSTA IMMUNOLÒGICA	32
1.2.4 CONCEPTE TH1/TH2	37
1.2.5 DIFERENCIACIÓ DE LES CÈL·LULES TH1 I TH2	40
1.2.6 CITOCINES TH2 I AL·LÈRGIA	46
1.2.7 REGULACIÓ DE LA SÍNTESI D'IMMUNOGLOBULINA E	49
1.2.8 ACTIVACIÓ DE BASÒFILS I MASTÒCITS	52
1.2.8.1 MEDIADORS DE MASTÒCITS I BASÒFILS	55
1.2.8.1.1 Histamina	56
1.2.8.1.2 Proteases neutres	57
1.2.8.1.3 Proteoglicans	58
1.2.8.1.4 Mediadors lipídics de nova síntesi	59
1.2.9 EOSINÒFILS I INFLAMACIÓ	61
1.3 ASMA AL·LÈRGICA	64
1.3.1 ASMA	64
1.3.2 CLASSIFICACIÓ CLÍNICO-FUNCIONAL DE L'ASMA	64
1.3.3 CLASSIFICACIÓ ETIOPATOGÈNICA DE L'ASMA	65
1.3.4 FACTORS CAUSALS EN L'ASMA	66
1.3.4.1 GENÈTICA I DETERMINANTS PRENATALS D'ASMA I ATÒPIA	66
1.3.4.2 FACTORS AMBIENTALS	69
1.3.4.2.1 Al·lergens	69
1.3.4.2.2 Infeccions	70
1.3.4.2.3 Contaminació ambiental	72
1.3.4.2.4 Tabaquisme	72
1.3.5 INFLAMACIÓ EN L'ASMA	73
1.3.6 TRACTAMENT DE L'ASMA BRONQUIAL	76

1.3.7	IMMUNOTERÀPIA	78
1.3.7.1	DEFINICIÓ	78
1.3.7.2	HISTÒRIA	78
1.3.7.3	EXTRACTES AL· LERGÈNICS	79
1.3.7.4	TIPUS DE VACUNES AL· LERGÈNIQUES.....	82
1.3.7.4.1	Vacunes aquoses.....	82
1.3.7.4.2	Vacunes depot i modificades.....	83
1.3.7.5	VIES D'ADMINISTRACIÓ DE LA IMMUNOTERÀPIA	83
1.3.7.6	PAUTES D'ADMINISTRACIÓ	84
1.3.7.7	CANVIS IMMUNOLÒGICS INDUÏTS PER LA IMMUNOTERÀPIA	85
1.3.7.7.1	Efectes antiinflamatoris.....	86
1.3.7.7.2	Mecanismes humorals	87
1.3.7.7.3	Anèrgia de les cèl· lules T.....	88
1.3.7.7.4	Canvis en la producció de citocines	89
2	JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS DE L'ESTUDI.....	95
2.1	JUSTIFICACIÓ.....	95
2.2	OBJECTIUS PRINCIPALS	97
2.3	OBJECTIUS INTERMEDIS	98
3	PACIENTS, MATERIAL I MÈTODE	99
3.1	PACIENTS.....	99
3.1.1	CRITERIS D'INCLUSIÓ	99
3.1.2	CRITERIS D'EXCLUSIÓ.....	99
3.1.3	GRUP DE INDIVIDUS NO AL· LÈRGICS	100
3.1.4	GRUP TRACTAMENT/GRUP CONTROL	100
3.2	MATERIAL.....	102
3.2.1	MATERIAL FUNGIBLE	102
3.2.2	MATERIAL NO FUNGIBLE	103
3.3	MÈTODES	105
3.3.1	TIPUS D'ESTUDI	105
3.3.2	PROVES "IN VIVO"	105
3.3.2.1	PROVES CUTÀNIES D'HIPERSENSIBILITAT IMMEDIATA	105
3.3.2.2	PROVES CUTÀNIES D'HIPERSENSIBILITAT IMMEDIATA A <i>D pteronyssinus</i> A DIFERENTS CONCENTRACIONS	107
3.3.2.3	PROVES DE PROVOCACIÓ CONJUNTIVAL	108
3.3.2.4	PROVES DE FUNCIÓ RESPIRATÒRIA.....	108
3.3.3	TRACTAMENT AMB IT A <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> I SEGUIMENT	109
3.3.3.1	IMMUNOTERÀPIA A <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	109
3.3.3.2	SEGUIMENT DE LA IMMUNOTERÀPIA.....	110
3.3.3.3	CONTROL CLÍNIC.....	111

3.3.3.4	SÍMPTOMES.....	111
3.3.3.5	MEDICACIÓ.....	112
3.3.3.6	MILLORANÇA.....	112
3.3.4	PROVES “IN VITRO”	113
3.3.4.1	EXTRACCIÓ SANGUÍNIA.....	113
3.3.4.2	QUANTIFICACIÓ D'IgE TOTAL I ESPECÍFICA.....	114
3.3.4.3	TÈCNiques CEL·LULARS.....	114
3.3.4.3.1	Determinació de leucòcits i fórmula leucocitària.....	114
3.3.4.3.2	Separació cel·lular	115
3.3.4.3.3	Estudi de viabilitat i quantificació de la concentració cel·lular	115
3.3.4.3.4	Criopreservació cel·lular	116
3.3.4.3.5	Descongelació cel·lular.....	116
3.3.4.3.6	Citometria de flux.....	117
3.3.4.3.7	Estudi de l'expressió de CD23 i CD86 en CPA.....	129
3.3.4.3.8	Estudi de l'expressió intracel·lular d'IL-4, IL-10 i IFN- γ en limfòcits T...	129
3.3.4.3.8.1	Estimulació inespecífica amb PMA i ionomicina	129
3.3.4.3.8.2	Detecció de citocines intracel·lulars	130
3.3.4.3.8.3	Anàlisi citomètrica.....	131
3.3.4.3.9	Cultius cel·lulars.....	132
3.3.4.3.9.1	Assajos de proliferació limfocitària.....	133
3.3.4.3.9.2	Reestimulació i detecció de citocines.....	133
3.3.5	ANÀLISI ESTADÍSTICA	134
3.3.6	OBTENCIÓ DE REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	135
4	RESULTATS	137
4.1	CARACTERÍSTIQUES GENERALS DELS INDIVIDUS PARTICIPANTS EN L'ESTUDI	137
4.2	ESTUDI CLÍNIC	141
4.2.1	PROVES CUTÀNIES D'HIPERSENSIBILITAT A <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	141
4.2.2	PROVES DE PROVOCACIÓ CONJUNTIVAL.....	144
4.2.3	PROVES DE FUNCIÓ RESPIRATÒRIA.....	145
4.2.4	SÍMPTOMES CLÍNICS.....	148
4.2.5	ÚS DE MEDICACIÓ.....	149
4.3	ESTUDIS “IN VITRO”	151
4.3.1	CONCENTRACIÓ SÈRICA D'IgE TOTAL I IgE ESPECÍFICA EN ELS PACIENTS NO TRACTATS I EN ELS TRACTATS AMB IT	151
4.3.2	EOSINOFILIA PERIFÈRICA.....	152
4.3.3	ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE RECEPTORS DE SUPERFÍCIE CD23 i CD86 EN CÈL·LULES PRESENTADORES DE L'ANTIGEN	153

4.3.3.1	ESTUDI EN PACIENTS ATÒPICS I INDIVIDUS SANS.....	153
4.3.3.2	ESTUDI EN EL GRUP DE PACIENTS AL·LÈRGICS NO TRACTATS AMB IT I EN EL GRUP DE PACIENTS TRACTATS AMB IT.....	154
4.3.4	ESTIMULACIÓ LIMFOCITÀRIA AMB PMA I IONOMICINA I DETECCIÓ DE CITOCINES INTRACEL·LULARS.....	156
4.3.4.1	ESTUDI EN PACIENTS ATÒPICS I INDIVIDUS SANS.....	156
4.3.4.2	ESTUDI EN EL GRUP DE PACIENTS AL·LÈRGICS NO TRACTATS AMB IT I EN EL GRUP DE PACIENTS TRACTATS AMB IT.....	159
4.3.4.2.1	Expressió de CD69.....	159
4.3.4.2.2	Expressió d'IL-4, IFN- γ i IL-10.....	161
4.3.4.3	CULTIUS CEL·LULARS.....	168
4.3.4.3.1	Assajos de proliferació limfocitària.....	168
4.3.4.3.2	Detecció de citocines en cultius no estimulats o estimulats amb antigen. Reestimulació amb PMA i ionomicina.....	170
4.3.4.3.3	Evolució en la producció de citocines al llarg de l'estudi en cultius cel·lulars estimulats amb <i>D pteronyssinus</i>	178
4.3.4.3.3.1	Producció específica d'IL-4.....	179
4.3.4.3.3.2	Producció específica d'IFN- γ	181
4.3.4.3.3.3	Producció específica d'IL-10.....	184
4.3.4.3.3.4	Índex entre IL-4/IFN- γ , IL-10/IFN- γ i IL-4/IL-10 específic per <i>D</i> <i>pteronysinus</i>	187
4.4	MILLORANÇA.....	191
4.4.1	MILLORANÇA I IMMUNOTERÀPIA.....	191
4.4.2	PROVES CUTÀNIES D'HIPERSENSIBILITAT A <i>Dermatophagoides</i> <i>pteronysinus</i>	192
4.4.3	PROVES DE PROVOCACIÓ CONJUNTIVAL.....	193
4.4.4	PROVES DE FUNCIÓ RESPIRATÒRIA.....	193
4.4.5	ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE RECEPTORS DE SUPERFÍCIE CD23 i CD86 EN CÈL·LULES PRESENTADORES DE L'ANTIGEN.....	195
4.4.6	ESTIMULACIÓ LIMFOCITÀRIA AMB PMA I IONOMICINA I DETECCIÓ DE CITOCINES INTRACEL·LULARS.....	197
4.4.6.1	EXPRESSIÓ DE CD69.....	197
4.4.6.2	DETECCIÓ DE CITOCINES INTRACEL·LULARS (IL-4, IFN- γ I IL-10).....	198
4.4.7	ASSAJOS DE PROLIFERACIÓ LIMFOCITÀRIA.....	202
4.4.8	CANVIS EN LA PRODUCCIÓ DE CITOCINES PELS CULTIUS ESTIMULATS AMB <i>D Pteronyssinus</i> EN EL GRUP AMB MILLORANÇA I EN EL GRUP SENSE MILLORANÇA.....	204
4.4.8.1	PRODUCCIÓ ESPECÍFICA D'IL-4.....	204
4.4.8.2	PRODUCCIÓ ESPECÍFICA D'IFN- γ	205

4.4.8.3	PRODUCCIÓ ESPECÍFICA D'IL-10.....	207
4.4.8.4	ÍNDIX ENTRE IL-4/IFN- γ , IL-10/IFN- γ I IL-4/IL-10 ESPECÍFIC PER <i>D Pteronyssinus</i>	208
4.5	RESUM DELS RESULTATS.....	212
5	DISCUSSIÓ.....	215
5.1	CARACTERÍSTIQUES GENERALS DE L'ESTUDI.....	215
5.2	ESTUDI CLÍNIC.....	219
5.2.1	PROVES CUTÀNIES D'HIPERSENSIBILITAT A <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	219
5.2.2	PROVES DE PROVOCACIÓ CONJUNTIVAL.....	221
5.2.3	PROVES DE FUNCIÓ RESPIRATÒRIA.....	222
5.2.4	SÍMPTOMES CLÍNICS I ÚS DE MEDICACIÓ.....	223
5.3	ESTUDIS "IN VITRO".....	226
5.3.1	CONCENTRACIÓ SÈRICA D'IgE TOTAL I IgE ESPECÍFICA.....	226
5.3.2	VALORS D'EOSINOFILIA PERIFÈRICA.....	227
5.3.3	ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE RECEPTORS DE SUPERFÍCIE CD23 i CD86 EN CÈL·LULES PRESENTADORES DE L'ANTIGEN.....	228
5.3.4	ESTIMULACIÓ LIMFOCITÀRIA AMB PMA I IONOMICINA I DETECCIÓ DE CITOCINES INTRACEL·LULARS IL-4, IFN- γ i IL-10.....	231
5.3.4.1	ESTUDI EN PACIENTS ATÒPICS I INDIVIDUS SANS.....	233
5.3.4.2	ESTUDI EN PACIENTS AL·LÈRGICS EN FUNCIÓ DELS PARÀMETRES IT I MILLORANÇA.....	237
5.3.5	CULTIUS CEL·LULARS.....	239
5.3.5.1	ASSAJOS DE PROLIFERACIÓ LIMFOCITÀRIA.....	239
5.3.5.2	CANVIS EN LA PRODUCCIÓ DE CITOCINES PELS CULTIUS ESTIMULATS AMB <i>D pteronyssinus</i>	240
5.4	DISCUSSIÓ GENERAL.....	244
6	CONCLUSIONS.....	253
7	ANNEXES.....	255
7.1	ANNEX 1.....	255
7.2	ANNEX 2.....	257
8	REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES.....	259