

# 1 INTRODUCCIÓ

## 1.1 REACCIONS D'HIPERSENSIBILITAT

El sistema immunitari té com funció respondre davant de substàncies alienes per eliminar-les de forma ràpida i eficaç. Habitualment, aquest procés té lloc de forma ordenada, desencadenant una resposta inflamatòria protectora de defensa, ben controlada, que culminarà amb l'eliminació de l'antigen i la resolució de la inflamació.

En ocasions existeix una disfunció en la regulació d'aquests processos, que pot provocar l'aparició de malalties. Les reaccions d'hipersensibilitat són respostes no apropiades o exagerades del sistema immunitari, enfront substàncies pròpies o externes, que poden induir lesions tissulars i malalties. Gell i Coombs varen dividir les reaccions d'hipersensibilitat en quatre tipus diferents, segons els mecanismes patogènics implicats<sup>1</sup>. Posteriorment altres autors varen descriure altres mecanismes mixts. Si bé la classificació de Gell i Coombs és útil a efectes didàctics, amb els avenços dels coneixements en el camp de la immunologia que s'han succeït en aquests anys, s'ha pogut objectivar que no és possible una divisió tan simple, en existir una connexió important entre els diferents tipus cel·lulars i les seves respostes. Segons aquesta classificació clàssica, existeixen quatre mecanismes bàsics de lesió en les reaccions d'hipersensibilitat relacionats amb diverses entitats patològiques, que s'enumeren en la Taula 1.

**Taula 1. Mecanismes de lesió en reaccions d'hipersensibilitat**

<b>Tipus de reacció</b>	<b>Anticossos/Cèl·lules</b>	<b>Manifestacions clíniques</b>
<b>Tipus I o al·lèrgica</b>	IgE	Anafilaxi, rinoconjuntivitis, asma, al·lèrgia alimentaria,...
<b>Tipus II o citotòxica</b>	IgM, IgG, fagòcits, cèl. mononuclears, citòlisi mediada per complement	Anèmia hemolítica, trombocitopènia, M. de Goodpasture,...
<b>Tipus III o per immunocomplexos</b>	Complexos antigen-anticòs (IgG, IgM, IgA)	Malaltia del sèrum, lupus eritematós sistèmic, glomerulonefritis,...
<b>Tipus IV o cel·lular retardada</b>	Limfòcits T sensibilitzats	Dermatitis de contacte, tiroïditis, encefalitis al·lèrgica,...
<b>Tipus V o mixt</b>		
<b>I i II</b>	IgE i precipitines IgG	Aspergilosi broncopulmonar al·lèrgica
<b>III i IV</b>	Complexos Ag-Ac i immunitat cel·lular	Alveolitis al·lèrgica extrínseca

Modificat de Gell PGH, Coombs RRA, Lachman PJ. Clinical aspects of immunology, 3<sup>ra</sup> ed. Oxford, Blackwell, 1997.

## 1.2 LA REACCIÓ AL·LÈRGICA

Les malalties al·lèrgiques ja varen ser descrites durant les civilitzacions grega i romana. En canvi, el terme “al·lèrgia” no va ser introduït en la literatura mèdica fins al 1906, quan von Pirquet<sup>3</sup> el va emprar per primer cop. La paraula deriva dels termes grecs *allos*, que vol dir “canviat”, i *ergos*, que significa “reacció”. Al 1923, el terme “atòpia”, paraula que deriva del grec i vol dir “fora de lloc”, va ser emprat per Coca i Cooke<sup>4</sup>, per descriure les reaccions cutànies consistents en pàpula i eritema que es presentaven de forma immediata en resposta als al·lèrgens en pacients amb símptomes respiratoris d'asma i rinoconjuntivitis. Aquest fenomen ja va ser objectivat prèviament per Cooke i van der Veer<sup>5</sup>. Al 1973, Pepys va definir l'atòpia com “aquella forma de reactivitat immunològica en l'individu, en el que es produeixen anticossos reagínics en resposta a l'exposició a al·lèrgens comuns de l'ambient de l'individu”. Aquesta definició no implica la presència de símptomes clínics, i només descriu la reactivitat immunològica. Ambdues paraules, al·lèrgia i atòpia, es fan servir a les publicacions mèdiques indistintament, per referir-se als processos immunològics relacionats amb malalties com l'asma, la rinitis o l'eczema. Alguns autors, com Röcken *et al.*<sup>6</sup>, consideren que la caracterització fenotípica d'atòpia requereix la presència de símptomes de malaltia atòpica (asma bronquial, rinitis al·lèrgica, dermatitis atòpica) i com a mínim dues proves positives “in vivo” o “in vitro” característiques d'atòpia (augment de la IgE sèrica, IgE específica o prova cutània d'hipersensibilitat immediata positiva a més d'un al·lèrgen ambiental), però no existien fins ara articles d'opinió de les organitzacions capdavanteres en el camp de l'al·lèrgologia que defineixin aquests conceptes. Al 2001 es va publicar una revisió de la nomenclatura en al·lèrgologia de l'Acadèmia Europea d'Al·lèrgologia i Immunologia Clínica (EAACI)<sup>7</sup>. Segons aquest consens, l'al·lèrgia es defineix com a “una reacció d'hipersensibilitat iniciada per mecanismes immunològics” i l'atòpia es

defineix com “una tendència personal o familiar per produir anticossos IgE en resposta a baixes dosis d’al·lergens, normalment proteïnes, i per desenvolupar símptomes típics com asma, rinoconjuntivitis o eczema/dermatitis”. Així, la reacció al·lèrgica és una reacció d’hipersensibilitat en la que el sistema immunològic de l’individu reacciona enfront una substància que és tolerada pels individus no al·lèrgics. Malgrat que clàssicament s’ha considerat que es tracta d’una reacció d’hipersensibilitat tipus I, en realitat participen diversos mecanismes immunològics<sup>8</sup>. L’expressió clínica d’aquesta reacció pot donar lloc a l’aparició de malalties i quadres clínics com:

- asma
- rinoconjuntivitis
- anafilaxi
- al·lèrgia a la picada d’himenòpters
- al·lèrgia alimentària
- al·lèrgia medicamentosa
- urticària (tan sols algunes)
- dermatitis atòpica

La seqüència d’esdeveniments que es produeixen en aquest tipus de reaccions, d’una forma esquemàtica, és la següent<sup>9</sup>. L’**exposició** a l’al·lergen, normalment de forma reiterada i en un individu susceptible condueix a la **sensibilització**, que suposa la producció d’anticossos immunoglobulina E (IgE) específics enfront aquest antigen. Aquesta IgE s’uneix als seus receptors específics d’alta afinitat (FcεRI) presents principalment en la superfície del mastòcit i del basòfil. En una **reexposició** a l’al·lergen, aquest pot reaccionar amb la IgE de la superfície d’aquestes cèl·lules, produint-se l’entrecruament entre les molècules de IgE adjacents i l’establiment de ponts entre els seus receptors. Això indueix l’**alliberament de mediadors** químics preformats (histamina, triptasa, etc.) i

d'altres formats de nova síntesi (leucotriens, prostaglandina D2, factor d'activació plaquetar, citocines, etc.), que mitjançant la seva **acció farmacològica** en els òrgans diana induirà l'aparició dels símptomes típics de la fase immediata de la reacció al·lèrgica en forma d'anafilaxi, broncospasme, rinitis, etc. Aquesta fase suposa l'inici d'una reacció inflamatòria posterior que dona lloc a la simptomatologia crònica. Després de l'exposició a l'antigen, la fase immediata va seguida, passades 4-6 hores, per una fase tardana, caracteritzada per edema dels teixits i per l'influx de cèl·lules inflamatòries. La degranulació mastocitària condueix a un augment de la permeabilitat vascular, inicia l'expressió per part de les cèl·lules endotelials de molècules d'adhesió com la VCAM-1 i la secreció de quimiocines com RANTES ("regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted") o l'eotaxina, donant lloc al reclutament selectiu d'eosinòfils, monòcits, limfòcits T i B, que amplifiquen i perllonguen la resposta inflamatòria al·lèrgica. Clínicament es tradueix en símptomes més persistents com congestió nasal, hiperreactivitat bronquial, etc.

### 1.2.1 AL·LERGEN

Les substàncies "estranyes", que l'organisme no reconeix com a pròpies, i que provoquen una resposta immunològica és denominen antigens o immunògens. Poden penetrar en l'organisme per diverses vies tal com la via digestiva, via inhalatòria (pneumoal·lergens) o per inoculació. L'**al·lergen** és aquell antigen capaç d'induir la síntesi d'immunoglobulina E (IgE) i de desencadenar la reacció al·lèrgica específica en unir-se a la IgE. Son proteïnes o glicoproteïnes de pes molecular entre 5.000 i 70.000 daltons. Altres substàncies d'estructura química més simple i de baix pes molecular, denominades **haptens**, poden adquirir caràcter antigènic quan s'uneixen a una proteïna portadora humana, com passa en ocasions en reaccions d'al·lèrgia a medicaments. Un al·lergen d'una sola espècie pot tenir diferents formes moleculars similars. Aquestes formes moleculars similars

s'anomenen **isoal·lergens** quan comparteixen unes propietats bioquímiques com pes molecular, funció biològica i una homologia en la seqüència dels aminoàcids al voltant del 67%<sup>10</sup>.

Encara que quan es parla de substàncies al·lergògenes es fa referència en general als àcars de la pols, al pol·len, a l'epiteli de gat o gos, etc., cal remarcar que només una petita part d'aquestes posseeixen caràcter al·lergogènic. En els extractes de material cru es poden trobar nombrosos components no al·lergènic i unes quantes proteïnes amb activitat al·lergènica. El sèrum d'un pacient al·lèrgic pot reconèixer diversos antígens en un mateix material al·lergènic. Aquest fenomen es comprova mitjançant la tècnica d'immunoblotting, en la que es determinen les bandes proteiques que fixen la IgE del sèrum del pacient al·lèrgic. Els antígens que provoquen reacció cutània o indueixen la producció de IgE específica en el 50% o més dels pacients al·lèrgics a una substància es denominen **al·lergens principals**<sup>11</sup> i generalment el seu pes molecular es troba entre 10.000 i 40.000 daltons. Els **al·lergens menors** són de pes molecular més heterogeni (2.500-150.000) i són aquells que sensibilitzen a menys del 10% dels individus al·lèrgics. Entre aquests dos tipus es troben els **al·lergens intermedis**.

### 1.2.2 IMMUNOGLOBULINA E

Praustnitz i Küstner a principis del segle XX van descriure una reacció per la qual es transferia passivament una positivitat en la prova cutània a un al·lergen, mitjançant la injecció de sèrum d'un pacient sensibilitzat a un altre no al·lèrgic<sup>12</sup>. Al 1966, Ishizaka *et al* varen aconseguir un antisèrum que contenia el factor que mediava la reacció de transferència passiva<sup>13, 14</sup>. Aquest factor que es transmetia, era una immunoglobulina amb activitat reagínica, que no es corresponia a cap de les conegudes fins a llavors. L'any 1967, Bennich i Johansson<sup>15,16</sup> la varen caracteritzar

a partir del sèrum d'un pacient afectat d'un mieloma productor d'aquesta immunoglobulina. En una reunió internacional al 1968, a la que van participar els dos grups mencionats, es va arribar al consens de denominar aquest nou tipus de proteïna **Immunoglobulina E** (IgE)<sup>17</sup>.

#### 1.2.2.1 ESTRUCTURA DE LA IMMUNOGLOBULINA E

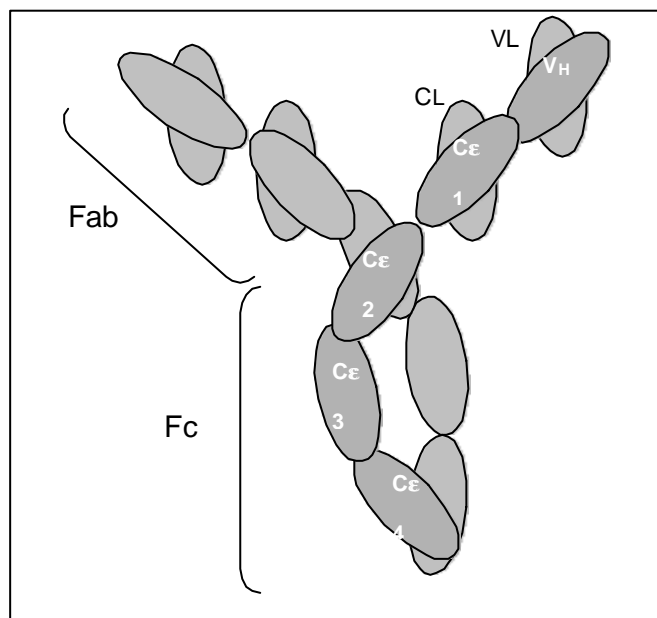
Les immunoglobulines (Igs) son glicoproteïnes formades per cadenes polipeptídiques, unides per ponts disulfur i d'altres unions no covalents. Cada unitat està composta per dos parells iguals de cadenes: dos **cadena lleugeres** (cadena L), amb un pes molecular de 25.000 daltons, i dos **cadena pesants** (cadena H), de pes entre 50.000 i 70.000 daltons. Les cadenes H ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ) determinen l'isotip d'immunoglobulina (IgG, IgM, IgA, IgE, e IgD, respectivament). Les cadenes L són comuns a tots els tipus d'immunoglobulines, i es presenten en dos formes: tipus **kappa** ( $\kappa$ ) o tipus **lambda** ( $\lambda$ ). Els extrems aminoterminals de les cadenes lleugeres ( $V_L$ ) i de les cadenes pesants ( $V_H$ ) son regions variables. Aquesta regió variable és l'encarregada de reconèixer i unir-se a l'antigen. Els extrems carboxiterminals són constants ( $C_L$  i  $C_H$ ), i és per on s'uneixen als seus receptors. Existeixen uns plegaments tridimensionals estabilitzats per ponts disulfur denominats dominis. La papaïna (enzim proteolític) escindeix la molècula de Ig en un fragment Fc (fragment cristalitzable) i en dos fragments Fab ("antigen binding")<sup>18</sup>.

Les cadenes pesants de les Igs estan codificades per gens del cromosoma (cr) 14, la cadena lleugera  $\kappa$  en el cr 2, i la  $\lambda$ , en el cr 22. La recombinació d'exons d'aquests gens dona lloc a la producció adequada de les cadenes de les immunoglobulines, i en codificar les regions variables, generen un repertori d'anticossos amb una especificitat antigènica al voltant de  $10^{11}$ . La regió variable de les cadenes H es produeix per la recombinació de tres exons contigus (V de

variable, D de *diversity* i J de *joining*)<sup>19</sup>.

La IgE està formada per dos cadenes pesants  $\epsilon$  i per dos cadenes lleugeres, idèntiques entre si ( $\kappa$  o  $\lambda$ ). En la seva cadena pesant, presenta quatre dominis constants ( $C_{\epsilon 1}$ - $C_{\epsilon 4}$ ) i un variable, com s'aprecia en la Figura 1. Els antígens s'uneixen a la regió Fab, mentre que la regió Fc és la que s'uneix als receptors de la IgE. En la unió a l'antigen estan implicades regions denominades hipervariables, tant de les cadenes H com de les L.

La IgE es presenta sempre en forma monomèrica. El seu coeficient de sedimentació és de 8S i el seu pes molecular d'uns 192 kDa i està altament glicosilada (12-15%). La seva vida mitjana és de 2 o 3 dies en sèrum i no travessa la placenta. La seva concentració sèrica és molt baixa (al voltant de 0.0005 mg/ml), per la qual cosa no és possible quantificar-la mitjançant els mètodes utilitzats habitualment per a les altres immunoglobulines<sup>20</sup>.



**Figura 1. Estructura de la IgE**



### 1.2.2.2 RECEPTORS DE LA IMMUNOGLOBULINA E

S'han caracteritzat dos tipus de receptors per a la IgE (FcεR): un d'alta afinitat (FcεRI) i un altre de baixa afinitat (FcεRII).

A més, una molècula de la família de les lectines tipus S, coneguda com a "macrophage cell-surface protein 2/epsilon binding protein" (Mac2/ε BP), que s'expressa en macròfags i neutròfils, i també s'ha descrit en els eosinòfils humans<sup>21</sup>, pot unir-se a la IgE i participar en la resposta protectora enfront paràsits.

#### 1.2.2.2.1 Receptor d'alta afinitat de la immunoglobulina E (Fcε RI)

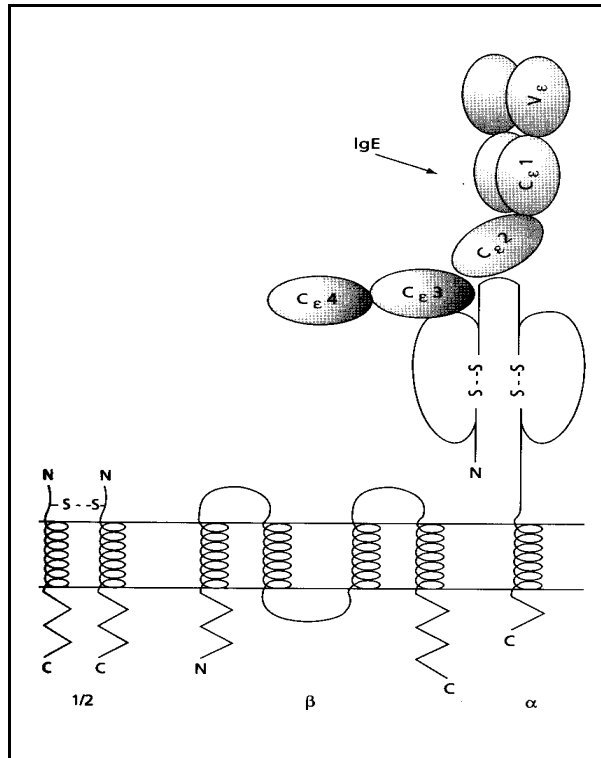
L'expressió del **Fcε RI** va ser descrita primer en basòfils i mastòcits<sup>22</sup>. Posteriorment s'ha demostrat la seva expressió en altres cèl·lules com les cèl·lules de Langerhans<sup>23,24</sup>, eosinòfils d'alguns pacients amb síndrome hipereosinofílica<sup>25</sup>, monòcits d'alguns individus atòpics<sup>26</sup>, i posteriorment en cèl·lules dendrítiques circulants<sup>27</sup> i plaquetes<sup>28</sup>. Es tracta d'un complex multimèric, com d'altres receptors de les Fc de les Igs (FcRs). S'ha demostrat que els receptors del Fc de les immunoglobulines (FcRs) són homòlegs, i pertanyen a la superfamília de les Igs<sup>29</sup>. El FcεRI està format per quatre cadenes polipeptídiques transmembrana: α, β i dos cadenes γ (FcRαβγ<sub>2</sub>) (Figura 2). Existeix una isoforma que manca de la cadena β (FcRαγ<sub>2</sub>), i és la que es troba en monòcits, cèl·lules de Langerhans i cèl·lules dendrítiques. Les cadenes FcεRIγ (o FcRγ) trobades inicialment en el receptor de la IgE, també són una subunitat de al menys un altre receptor de Fc, el receptor de baixa afinitat de la IgG (FcγRIII)<sup>30</sup>, així com del receptor de la cèl·lula T (TCR)<sup>31</sup>.

La FcεRIα sembla tenir una funció exclusiva com a lligand per a la unió amb la IgE<sup>32</sup>, a través del seu domini extracel·lular. El complex βγ<sub>2</sub> funciona transduint el senyal a l'interior de la cèl·lula. La cadena β (FcRβ) s'ha demostrat que funciona

amplificant els senyals d'activació cel·lular mediades per la subunitat  $\gamma$  ( $FcR\gamma$ )<sup>33</sup>, no tan sols en la fase inicial d'activació cel·lular, sinó també en respostes tardanes de degranulació. S'especula que els complexos  $FcR\alpha\gamma 2$ , que manquen de cadena  $\beta$ , podrien participar en funcions de presentació de l'antigen. L'absència de la cadena  $\beta$  i, per tant, de la seva funció amplificadora de senyal, evitaria una activació excessiva d'aquestes cèl·lules.

Diversos treballs d'investigació demostren la participació de  $Fc\epsilon RI$  en funcions de defensa enfront paràsits. Jankovic *et al* observaren en ratolins infectats per *Schistosoma mansoni*, que els que eren deficients en l'expressió de la cadena  $Fc\epsilon RI\alpha$  presentaven granulomes hepàtics d'un volum major que els ratolins no deficients. En aquest estudi no es va demostrar una alteració en la producció de citocines<sup>34</sup>, es a dir que una menor resposta front la infecció no sembla ser degut a un canvi en la producció de un tipus concret de citocines. També s'ha demostrat que la resistència de ratolins enfront larves de la paparra *Haemaphysalis longicornis*, depèn de la presència de IgE, de mastòcits i de la seva interacció a través del  $Fc\epsilon RI$ <sup>35</sup>.

S'ha observat que els individus atòpics presenten un augment en l'expressió de  $Fc\epsilon RI$  en monòcits, eosinòfils, basòfils i cèl·lules de Langerhans respecte a individus sans. Aquest augment es relaciona amb la concentració de IgE sèrica<sup>26,36</sup>, que modula la seva expressió.



**Figura 2. Interacció IgE-Fcε RI**

#### 1.2.2.2.2 Receptor de baixa afinitat de la immunoglobulina E (Fcε RII)

El **Fcε RII** va ser descrit inicialment en les cèl·lules B<sup>37, 38</sup>, i posteriorment en una gran varietat de cèl·lules com eosinòfils hipodensos, macròfags, plaquetes, cèl·lules epitelials, cèl·lules T i cèl·lules NK<sup>39,40,41,42</sup>. També es coneix com a **CD23**, ja que el desenvolupament d'anticossos monoclonals front el Fcε RII va permetre demostrar que aquest era idèntic a l'antigen de diferenciació CD23, conegut anteriorment com "Epstein Barr Virus Cell Surface" (EBVCS) o BLAST-2<sup>43, 44</sup>.

El Fcε RII/CD23 és una sialoglicoproteïna de 45kD, d'una sola cadena (Figura 3). A diferència del Fcε RI, no pertany a la superfamília de les immunoglobulines, sinó a la superfamília de les lectines animals dependents de calci, englobades dins les selectines, a la que pertanyen algunes molècules d'adhesió i que presenten una

configuració especial ja que l'extrem carboxi-terminal és extracitoplasmàtic i l'amino-terminal és intracitoplasmàtic.

El FcεRII/CD23 està implicat en diferents funcions com l'adhesió cel·lular, la presentació de l'antigen, el creixement i diferenciació de limfòcits B i T, el rescat de cèl·lules del procés d'apoptosi, l'alliberament de mediadors citotòxics (especialment en la defensa contra paràsits), i la regulació de la síntesi d'IgE<sup>45</sup>. Existeixen diversos treballs que demostren que el FcεRII/CD23 intervé internalitzant el complex IgE-antigen i que afavoreix la presentació de l'antigen per part de la cèl·lula B al limfòcit T<sup>46,47,48</sup>. El FcεRII/CD23 pot donar lloc a fragments solubles denominats sFcεRII/sCD23. Aquests fragments, de pes molecular de 37, 33, 29, 25 i 17 kDa, s'originen per autoproteolisi del FcεRII/CD23 unit a membrana. En funció del seu pes molecular, poden regular la síntesi de IgE, bé incrementant-la (fragments de més de 25kDa) o disminuint-la<sup>49, 50</sup>.

S'han descrit dos isoformes del CD23<sup>51</sup>, el FcεRIIa i el FcεRIIb, que es diferencien en la seva porció intracitoplasmàtica (6 aminoàcids del FcεRIIa són substituïts per uns altres 5 en el FcεRIIb), que es generen per la utilització de diferents punts de inici de la transcripció d'un sol gen. El FcεRIIa s'expressa de forma constitutiva en els limfòcits B, mentre que la isoforma b és induïda, especialment per la IL -4, però també per altres citocines com la IL-13 en limfòcits i monòcits<sup>52</sup>. En eosinòfils, plaquetes, macròfags i cèl·lules de Langerhans, també s'ha evidenciat l'expressió de FcεRIIb<sup>42, 53</sup>. El FcεRII/CD23b s'ha associat amb la fagocitosi de complexos d'IgE, i per tant, amb immunitat IgE-mediada en les fases efectores de reaccions al·lèrgiques i de defensa contra infeccions per paràsits. La isoforma FcεRII/CD23a participa en l'endocitosi de partícules recobertes per IgE i probablement contribueix a la presentació de l'antigen mitjançant la IgE per part de les cèl·lules B<sup>54</sup>.

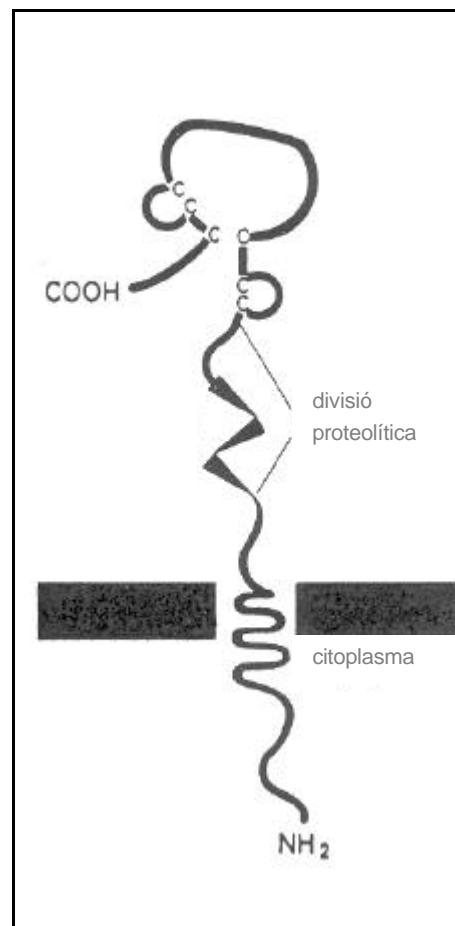
S'ha objectivat que l'expressió del FcεRII/CD23 està regulada per citocines com la interleucina 4 (IL-4) que la indueix, o l'interferó gamma (IFN-γ) que inhibeix l'efecte inductor de la IL-4<sup>51,55</sup>. L'expressió del CD23 induïda per la IL-4 té un efecte sobre la síntesi d'IgE, ja que el CD23 pot interaccionar amb el CD21, una molècula que s'ha identificat com a un receptor del complement i que pot unir-se al virus Epstein-Barr<sup>56</sup>. Hi ha evidències que les interaccions CD21-CD23 poden ser importants en la regulació de la síntesi de IgE incrementant-la. La seva expressió també és modulada per la unió de la IgE que estabilitza el receptor i inhibeix processos autoproteolítics del CD23.

La unió de IgE o complexos immunes de IgE a la regió lectina del FcεRII/CD23 transdueix un senyal inhibitori per a la síntesi de IgE<sup>57</sup>. En canvi, les formes solubles (sFcεRII/sCD23) de més de 25kD que mantenen una porció determinada de la seva estructura promouen la producció d'IgE per, al menys, dos mecanismes: per activació del CD21 i unint-se i atrapant la IgE del medi, prevenint la retroalimentació negativa a través del FcεRII/CD23 de membrana<sup>58</sup>.

El FcεRII/CD23b, amb la seva unió a la IgE, pot promoure la generació de diferents mediadors com factors citotòxics, quimiocines, mediadors pro i antiinflamatoris en macròfags alveolars<sup>59</sup>, plaquetes<sup>60</sup> i eosinòfils<sup>61</sup>, potenciant els seus efectes en la reacció inflamatòria. El sFcεRII/sCD23 pot unir-se al CD11b/CD11c, per promoure l'alliberament de diferents mediadors, especialment de monòcits, com IL-1β, IL-6 i factor de necrosi tumoral alfa (TNF-α)<sup>62</sup>.

L'expressió del CD23 està augmentada en individus amb malalties al·lèrgiques<sup>63, 64</sup>, tant en la membrana de cèl·lules B com en monòcits, i s'ha descrit l'expressió de la isoforma FcεRII/CD23b en limfòcits de sang perifèrica sense requerir l'estimulació amb IL-4<sup>51</sup>. Aquest fet apuntaria a que una regulació anòmala de la producció d'IL-

4 pot ser la responsable de l'augment de l'expressió de FcεRII en els pacients atòpics. Altres autors demostren que en individus al·lèrgics està incrementada la producció de sCD23<sup>65</sup>.



**Figura 3. Receptor de baixa afinitat per la IgE**

### 1.2.2.3 FUNCIONS DE LA IgE

Les dues funcions principals de la IgE són la seva participació en la reacció al·lèrgica i en la defensa enfront paràsits.

La IgE s'uneix als receptors d'alta afinitat FcεRI dels basòfils i mastòcits. Inicialment

reconeix el receptor mitjançant el domini Cε4, i posteriorment s'estabilitza mitjançant el domini Cε3. Quan s'inicia la reacció al·lèrgica, la unió de l'al·lèrgen a la IgE, provoca un entrecreuament entre complexos IgE/FcεRI adjacents. Els coneixements actuals evidencien que la formació de ponts entre els receptors és un fet crucial per activar l'alliberament de mediadors, inclús en absència d'IgE<sup>66</sup>. Aquest entrecreuament es produeix per antígens polivalents, com els al·lèrgens, però també es pot induir amb anticossos anti-receptor, anti-IgE o fragments oligomèrics d'IgE<sup>67</sup>. En canvi, no es produeix l'activació cel·lular quan la IgE monomèrica s'uneix al receptor. L'agregació de regions Fc, activa una cascada de reaccions bioquímiques que inclouen l'activació de proteín-cinases intracel·lulars, fosfolipases i mobilització de calci, i que condueixen a una ràpida degranulació amb alliberament de mediadors proinflamatoris preformats o sintetitzats de nou. Entre aquests mediadors cal destacar la histamina, leucotriens, prostaglandines i citocines com IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, TNF-α i factor estimulador de colònies de granulòcits/macròfags (GM-CSF), causant les reaccions d'hipersensibilitat immediata, i participant en la posterior resposta tardana.

La interacció entre la IgE i el FcεRII/CD23 s'ha relacionat amb diverses funcions. Inicialment és va descriure la seva participació en les funcions d'inducció de la síntesi de IgE<sup>68</sup> i el manteniment i modulació de la resposta IgE<sup>69</sup>, tant per part del FcεRII/CD23 unit a membrana com dels seus fragments solubles (FcεRII/CD23s). També actua com a molècula efectora en reaccions immunitàries mediades per la IgE com les reaccions al·lèrgiques i la citotoxicitat contra paràsits<sup>70</sup>.

### 1.2.3 RESPOSTA IMMUNOLÒGICA

El sistema immunitari té com a funció distingir entre les substàncies pròpies i les estranyes. Els mecanismes immunitaris no específics constitueixen la *immunitat innata* i corresponen a les barreres físiques, factors solubles i limfòcits diferents del B i els T. La defensa antígen-específica o *immunitat adaptativa* es basa en l'actuació de les cèl·lules T i B. Aquesta vigilància immunològica implica que el sistema immunitari de l'individu està constantment examinant molècules de múltiples substàncies. Quan troba una estructura que no ha après a reconèixer com a pròpia (microorganismes, cèl·lules tumorals, etc.), la tractarà com a un "invasor" i desenvoluparà una resposta de defensa.

L'inici de la resposta immune específica requereix el processament de l'antigen, el reconeixement dels epítops per les cèl·lules B i T i l'expansió clonal i diferenciació d'aquests limfòcits antígen-específics en cèl·lules efectores. El repertori potencial de receptors antígen-específics expressats en les cèl·lules T i B és el resultat de la recombinació aleatòria dels gens que codifiquen el *receptor de la cèl·lula T* (TCR) i de les Ig, respectivament. La capacitat de mantenir una memòria immunològica permet a l'individu desenvolupar una resposta ràpida quan es produeix una reexposició al mateix antigen<sup>19</sup>.

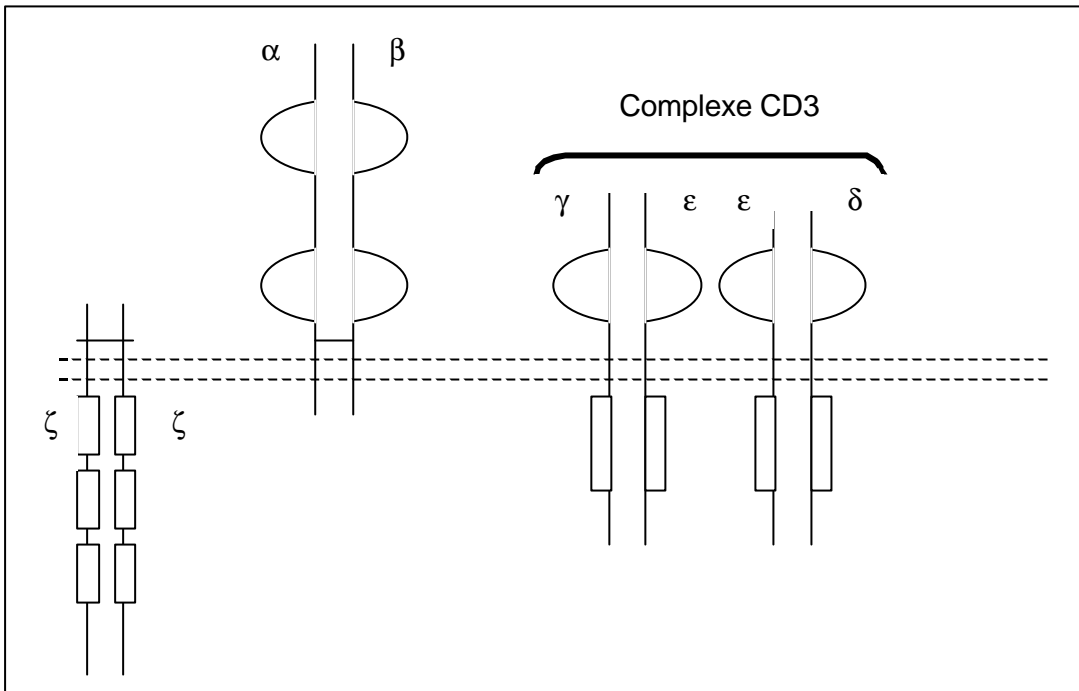
Els principals agents del reconeixement immunològic específic són els limfòcits. A la seva superfície tenen receptors de reconeixement dels *determinants antigènics* o *epítops* dels antígens. Cada limfòcit té un tipus de receptor molt específic per a un epítop. Al naixement, existeixen milions de tipus de limfòcits amb receptors diferents, que poden reconèixer milions d'epítops diferents. Durant el desenvolupament del sistema immune, en el timus es produeix una selecció negativa i positiva de les cèl·lules T, sobrevivint només aquelles cèl·lules que reconeixen els *antígens leucocitaris humans* (HLA), també denominats *complex*



*major d'histocompatibilitat* (MHC), propis i que s'uneixen a ell sense excessiva afinitat. Així queda un repertori de limfòcits, que poden reconèixer de forma molt específica un epítot, i fer una expansió clonal quan entren en contacte amb aquest antigen.

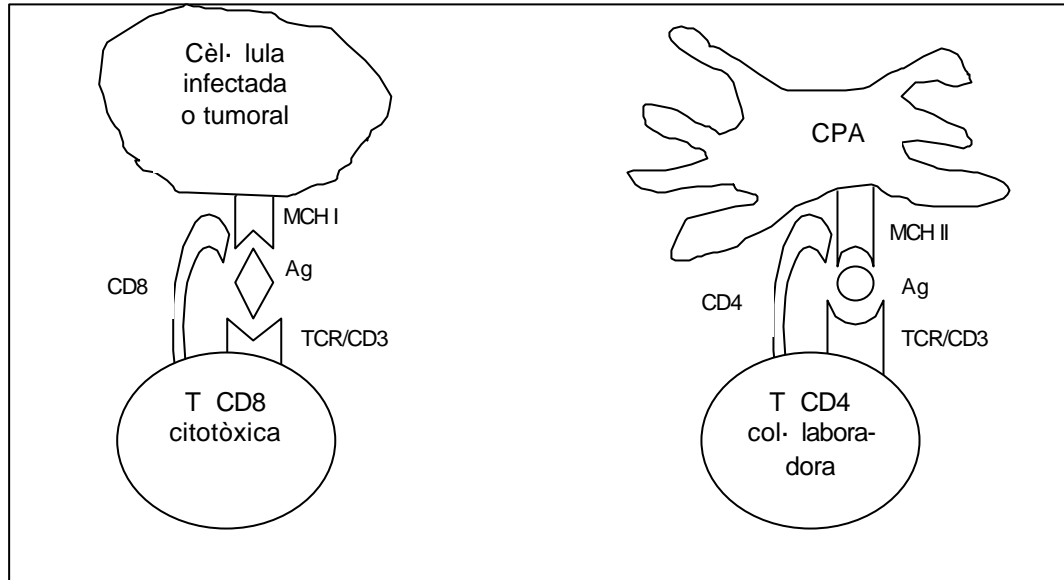
Els limfòcits T (LT) reconeixen determinants antigènics que els hi presenten altres cèl·lules en la seva superfície. Quan un antigen penetra dins l'organisme, les *cèl·lules presentadores de l'antigen* (CPA), que poden ser macròfags, cèl·lules B, cèl·lules dendrítiques, etc., el capten mitjançant fagocitosi o l'internalitzen, el processen mitjançant fagolisosomes, i finalment, presenten en la seva superfície els *pèptids antigènics* en el context del MCH.

L'obtenció d'anticossos monoclonals ha permès caracteritzar diferents molècules expressades en la superfície de la membrana de diferents tipus cel·lulars. Són els denominats *cluster of differentiation* (CD). Aquesta nomenclatura és la que s'utilitza habitualment per referir-se a aquestes molècules de superfície. Les molècules CD4 i CD8 actuen conjuntament amb el *complex receptor de la cèl·lula T*. Els limfòcits T expressen el CD3, junt amb el *receptor de la cèl·lula T* (TCR) formant un complex funcional. Aquest receptor TCR és un heterodímer format per cadenes denominades  $\alpha$  i  $\beta$  en el 90% dels casos, i per una cadena  $\gamma$  i una  $\delta$  en el 10% restant. Aquestes cadenes transmembrana tenen una porció carboxiterminal constant i una aminoterminal variable amb un domini altament polimòrfic que li confereix l'especificitat clonal específica per l'antigen. El TCR s'uneix de forma no covalent al complex CD3 (Figura 4) que transdueix el senyal a l'interior de la cèl·lula després de la unió del TCR a l'antigen<sup>71</sup>.



**Figura 4. El complex receptor de la cèl·lula T (TCR)**

Les molècules CD4 i CD8 actuen en la superfície cel·lular dels limfòcits T, com a receptors, juntament amb el complex TCR/CD3. Participen en el reconeixement antigènic, estableixen la unió entre MHC-Ag i TCR, i constitueixen elements importants en el sistema de transducció dels senyals intracel·lulars. El CD4, present en els *limfòcits T col·laboradors*, i el CD8, present en els *limfòcits T citotòxics*, interactuen respectivament amb determinants invariants de les molècules de classe II i de classe I del MHC presents en les CPA (Figura 5).



**Figura 5. Interacció entre el MHC/HLA-antígen i el receptor de la cèl·lula T**

Les MHC/HLA de classe I són expressades en totes les cèl·lules nucleades. Les proteïnes “endògenes” (produïdes a l’interior de les cèl·lules) són presentades preferencialment per MHC/HLA de classe I. Això permet que qualsevol cèl·lula infectada (per bacteris intracel·lulars, virus, etc.) o cèl·lula tumoral pugui transmetre un senyal a les cèl·lules T CD8 citotòxiques i establir contactes intercel·lulars, presentant el complex pèptid estrany/MHCI al TCR/CD3 de la cèl·lula efectora, que podrà destruir la cèl·lula patològica. En canvi, les MHC/HLA de classe II, presenten preferencialment proteïnes exògenes (bacteris extracel·lulars, toxines, al·lèrgens, etc.). Aquestes molècules són expressades en les CPA professionals, que capten i processen els antígens abans de presentar-los a les cèl·lules T CD4 col·laboradores. Aquestes cèl·lules efectores secretaran citocines que modularan la resposta immunitària humoral o cel·lular enfront a l’antigen presentat.

Després d’aquest primer senyal d’activació, corresponent a l’interacció antígen-TCR, es precisa dels denominats segons senyals mitjançant la participació de

molècules accessòries, d'adhesió intercel·lular i limfocines. Si només participa el TCR, enlloc d'activació es produeix anèrgia.

Els segons senyals es produeixen per interaccions entre cèl·lules a través de molècules expressades en la seva superfície. Entre les molècules de superfície de la cèl·lula T s'inclouen el CD28, que té com lligand el B7; el CD154 (ligand del CD40), que s'uneix al CD40; i el CD2, lligand del CD58.

Les cèl·lules dendrítiques, que són uns potents estimuladors de cèl·lules T "naive", expressen gran quantitat de les molècules coestimuladores B7 i CD40. La unió del CD154 (induïda en cèl·lules CD4 estimulades per l'antigen) pel CD40 (expressada constitutivament en cèl·lules B) activa proteín cinases de la cèl·lula B que intervenen en el canvi (*switching*) de classe d'immunoglobulina. Un altre receptor amb funcions de coestimulació és el CD45, un enzim amb activitat fosfatasa, que és crític per a l'activació de cèl·lules T i B. Les molècules que es lliguen en aquest receptor encara s'han de determinar, però podrien incloure el CD22, un receptor d'adhesió de la superfície de les cèl·lules B.

A més d'aquesta interacció entre molècules, també és important l'acció de determinades substàncies solubles. Així, algunes citocines com la interleucina (IL) 1, IL-6 i TNF- $\alpha$ , indueixen senyals coestimuladors. En canvi, la IL-10 i el factor transformador de creixement  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), amb freqüència produeixen senyals inhibidors.

De forma similar, la unió de la molècula CTLA-4 de la superfície de la cèl·lula T pel B7, indueix un senyal negatiu<sup>72</sup>.

Altres molècules que intervenen en la interacció CPA/LTh 2, són les molècules d'adhesió cel·lular, que mitjançant la seva interacció augmenten la força d'unió. En el limfòcit T està present l'antigen de funció limfocitària LFA1 (CD11a/CD18), un

membre de la superfamília de les immunoglobulines. Actua en funcions d'adhesió unint-se a les molècules d'adhesió intercel·lular (ICAM)-1, membre també de la superfamília de les immunoglobulines que s'expressa a la superfície de la CPA<sup>71</sup>.

A més, la unió del LFA del LTh2 activat amb la ICAM-1 del limfòcit B, activa aquest últim, que es transforma en *cèl·lula formadora d'anticossos* o *cèl·lula plasmàtica*. Amb la influència de la IL-4 e IL-13, aquests anticossos seran del tipus IgE.

La *cèl·lula T CD4* modularà la resposta immune efectora humoral i cel·lular, activant més *cèl·lules T*, *cèl·lules B* i altres *cèl·lules*, i originant poblacions de *cèl·lules T* memòria.

#### 1.2.4 CONCEPTE TH1/TH2

Amb l'obtenció d'anticossos monoclonals, va ser possible establir l'existència de diferents subpoblacions limfocitàries, segons els receptors expressats en la seva superfície. Però aquesta divisió no es corresponia sempre amb una divisió funcional clara. A la dècada dels 80, Mossman i col·laboradors van descriure en models murins, dos tipus de clones de *cèl·lules T helper (CD4+)* segons les citocines que produïen, denominades Th1 i Th2<sup>73, 74</sup>, que posteriorment també s'han descrit en limfòcits humans. Les característiques principals de les *cèl·lules* tipus Th1 i Th2 són les següents:

- Les *cèl·lules Th1* segreguen IL-2, IFN- $\gamma$  i TNF- $\beta$ , que actuen en reaccions d'immunitat cel·lular i hipersensibilitat retardada, afavorint l'actuació de macròfags i respostes citotòxiques.
- Les *cèl·lules Th2* produeixen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 i IL-13, involucrades en respostes immunitàries humorals i reaccions d'hipersensibilitat immediata.

Apart d'aquestes dues poblacions, també s'ha descrit una tercera, denominada Th0, que produiria citocines dels dos tipus anteriors (IL-2, IL-4 i IFN- $\gamma$ ). Encara es desconeix si el fenotip Th0 s'ha d'expressar inevitablement com a pas intermedi en la via de diferenciació cap els altres tipus de fenotips. De fet, és probable que les cèl·lules Th1 i Th2 corresponguin als extrems d'un ventall de cèl·lules T que podrien produir diferents combinacions de citocines.

Posteriorment, en cèl·lules CD8, també s'ha descrit una dicotomia similar en la producció de citocines tipus 1 i 2.

Recentment s'han descrit unes noves subclasses de cèl·lules T CD4+ caracteritzades per la seva habilitat per produir gran quantitat de citocines immunoreguladores com IL-10 i/o TGF- $\beta$ , que poden estar implicades en funcions de regulació de les respostes immunitàries. Inicialment s'han denominat Th3 les cèl·lules T CD4+ productores de TGF- $\beta$  que han mostrat una activitat reguladora en models experimentals d'encefalitis autoimmune<sup>75, 76</sup>, colitis<sup>77, 78</sup>, diabetis<sup>79</sup> i malaltia autoimmune induïda per HgCl<sub>2</sub><sup>80</sup>. Tant en ratolins com en humans, s'ha identificat un altre tipus de cèl·lules T reguladores, que poden estar relacionades amb les Th3, que s'han denominat cèl·lules T reguladores 1 (Tr1). Aquestes Tr1 s'indueixen "in vitro" mitjançant l'estimulació de cèl·lules T en presència d'IL-10, i un cop generades, aquestes cèl·lules produeixen altes concentracions d'IL-10<sup>81</sup>, i aquesta citocina sembla tenir un paper molt important en la inducció de tolerància per part de les cèl·lules T enfront antígens com poden ser els al·lèrgens<sup>82</sup>.

Aquest paradigma de cèl·lules Th1/Th2, s'ha comprovat tant en clones cel·lulars generades "in vitro" com en experiments "in vivo". A més, encara que la divisió no sembla tan clara, també s'han identificat en limfòcits T humans<sup>83</sup> i s'han relacionat

amb diferents malalties<sup>84</sup>. Les malalties al·lèrgiques són un exemple típic de situació patològica associada a un predomini Th2, mentre que algunes malalties autoimmunes (diabetis mellitus tipus I, esclerosi múltiple, etc.), la defensa antivírica i antibacteriana per patògens intracel·lulars o la dermatitis de contacte, s'han relacionat amb situacions de predomini Th1.

Degut al fet de que la estricta dicotomia descrita en clones murines Th1 i Th2 rarament es troba en humans, la definició d'aquestes poblacions ha anat evolucionant. Així Romagnani va redefinir les cèl·lules Th 2 com aquelles que produeixen IL-4, i amb freqüència IL-5, IL-10 i IL-13, però no IFN- $\gamma$ <sup>85</sup>. En una posterior revisió, Hu-Li *et al* van definir les cèl·lules Th2 com aquelles que tenen capacitat per produir IL-4, mentre que les Th1 no la tenen<sup>86</sup>.

El model Th1/Th2, aparentment simple i atractiu per explicar el mecanisme immunològic de respostes a diversos antígens així com la patogènesi de moltes malalties, és molt més complex que el que es suggeria inicialment. Per exemple, la producció preferent d'algunes de les citocines identificades com a tipus Th2 pot variar considerablement i modificar les funcions específiques de les cèl·lules Th2. Aquesta heterogènia en la producció de citocines pot explicar la producció preferencial d'un isotipus concret d'immunoglobulina (IgE, IgG1, IgG4, IgA,...) en les respostes immunes humorals. A més, sembla que algunes cèl·lules Th2 poden tenir funcions reguladores de certes respostes immunes (per exemple, respostes autoimmunes inflamatòries). Alguns investigadors apunten que les malalties al·lèrgiques podrien representar una aberració patològica de la tolerància de les superfícies mucoses, en la qual, les cèl·lules T que haurien de desenvolupar una funció "reguladora/supressora" Th2 (o Th1), és transformen en cèl·lules Th2 "col·laboradores" que inicien i intensifiquen la immunitat humoral i la inflamació al·lèrgica<sup>87</sup>.

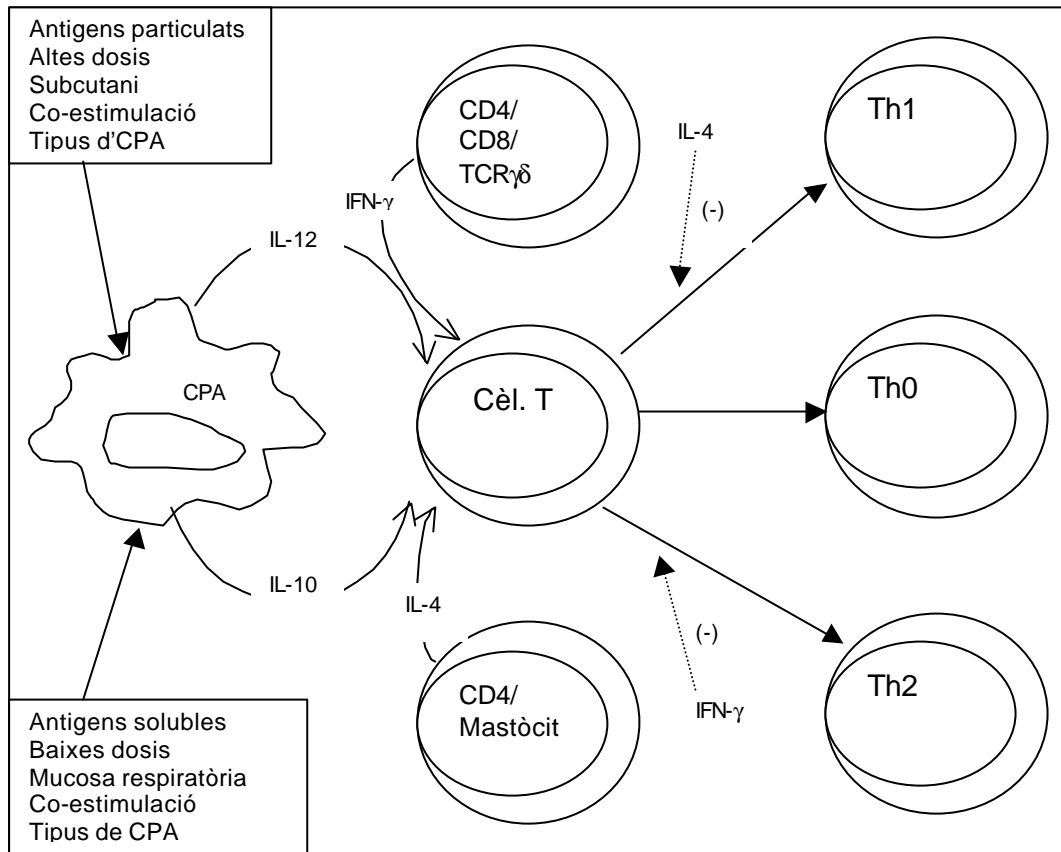
### 1.2.5 DIFERENCIACIÓ DE LES CÈL·LULES TH1 i TH2

Les cèl·lules d'aquests dos subtipus es diferencien a partir d'una cèl·lula CD4+ "naive" precursora comuna. Ràpidament després del seu contacte amb l'antigen es polaritzen cap a la producció d'un tipus de citocines, depenent, entre d'altres factors de:

- Estructura i dosi de l'antigen
- Tipus de cèl·lula presentadora de l'antigen (CPA)
- Potència d'activació de la cèl·lula T
- Activitat paracrina de citocines presents en el microambient (IL-12, IL-4,...)
- Senyals coestimuladors (CD80 o CD86,...)

La diferenciació en un o altre tipus de cèl·lula Th es determina a partir de l'activació antígen-específica de la cèl·lula (Fig. 6). Un dels factors més importants és la presència de citocines en el medi en el moment d'iniciar-se la diferenciació d'aquestes cèl·lules. Existeix un mecanisme de contrarregulació segons les citocines produïdes. La IL -4 és el senyal més important per a la diferenciació de les cèl·lules Th2. "In vitro", la presència de IL-4 en el moment de la presentació de l'antigen determina la diferenciació en cèl·lules productores de IL-4<sup>88</sup>. En condicions fisiològiques, no està clar l'origen de la IL-4.





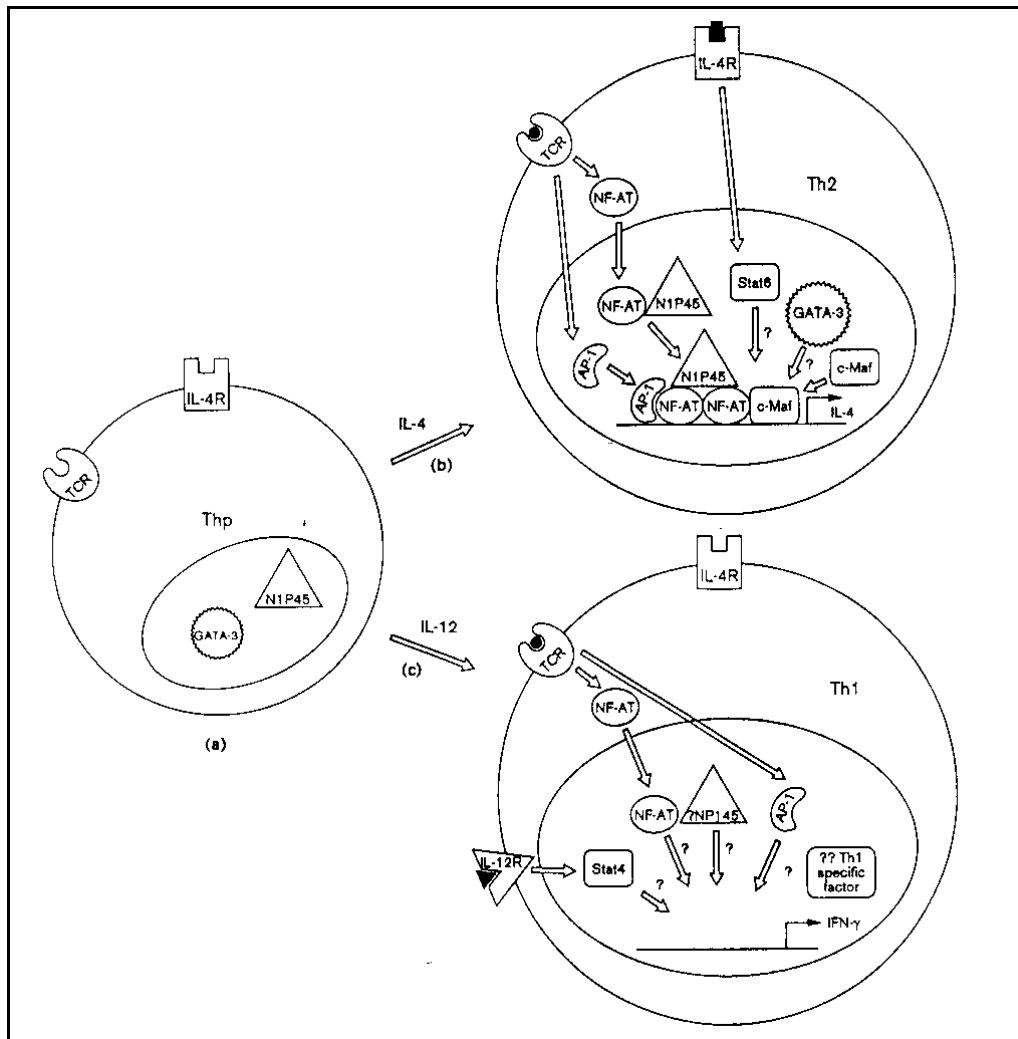
**Figura 6. Factors involucrats en la generació de cèl·lules T del tipus Th0, Th1 i Th2.**

Els basòfils i els mastòcits poden produir IL-4 en resposta a l'entrecreuament dels seus receptors  $Fc\epsilon R1$  o  $Fc\gamma RII^{89}$ . També pot ser produïda per cèl·lules B, T o per una subpoblació de CD4 que expressen l'antigen  $NK1.1^{90}$ . La IL-4 inhibeix el desenvolupament de cèl·lules Th1.

La presència de citocines com IFN- $\gamma$ , IL-12 i TGF- $\beta$  promou la generació de poblacions Th1. La IL-12 es pot originar en diferents tipus cel·lulars tal com les cèl·lules B i, principalment, en els macròfags en resposta a certs productes microbians. La IL-12 pot actuar directament derivant la resposta de la cèl·lula T cap a un tipus Th1 o indirectament, estímulant la producció d'IFN- $\gamma$  per cèl·lules "natural killer" (NK).

La producció d'un tipus de citocina depèn de l'expressió de gens específics per aquella citocina. Basant-se en els darrers treballs d'investigació en aquest camp,

s'ha proposat un model de com s'activa cadascun dels gens per a la producció d'IL-4 o IFN- $\gamma$ , que es descriu a la Fig. 7<sup>91</sup>. (a) Les cèl·lules T precursors Thp en repòs, no són capaces de segregar citocines, però expressen el factor de transcripció GATA-3, i NIP-45. Quan es produeix l'estimulació antigènica, bé en presència de IL-4 (b) o IL-12 (c), les Thp es diferencien cap a un fenotipus Th2 o Th1, respectivament. (b) L'estimulació antigènica en condicions inductores Th2 (presència de IL-4) resulta en l'expressió del gen de la IL-4 en la cèl·lula T, mitjançant la inducció d'una sèrie de factors de transcripció: la IL-4 s'uneix al receptor de la IL-4 de les cèl·lules Thp donant lloc a l'activació de vies de senyals d'activació com la *transductora del senyal i activadora de la transcripció-6* (signal transducer and activator of transcription-6 o Stat6); l'estimulació del TCR dóna lloc a l'activació i translocació nuclear de proteïnes NF- $\kappa$ B, que així poden interactuar amb el NIP45; les proteïnes AP-1 són sintetitzades; s'incrementa l'expressió de GATA-3 i s'inicia la producció de la proteïna c-Maf. (c) En el cas de cèl·lules Thp activades en condicions inductores Th1, els diversos passos que es succeeixen no són tan coneguts però sembla que no s'indueix l'expressió de c-Maf i desapareix l'expressió de GATA-3. La manca d'aquests dos senyals contribueix al desenvolupament de cèl·lules Th1, i per tant, a l'absència d'expressió de IL-4. L'expressió d'altres factors de transcripció com Stat4, AP-1, NF- $\kappa$ B, NIP45 i altres factors Th1 específics no identificats, indueixen l'expressió d'IFN- $\gamma$ , citocina tipus Th1.



**Figura 7. Expressió dels gens per a les citocines en cèl·lules T**

De Szabo SJ, Glimcher LH, Ho IC<sup>91</sup>

Thp = cèl·lula T helper precursor. Els interrogants indiquen incerteses.

El tipus de CPA té un paper important en la generació de cèl·lules tipus Th1 o Th2. Les CPA produeixen el primer senyal d'activació per als precursors de la cèl·lula Th, són una font de diferents citocines i participen en els senyals coestimuladors d'activació cel·lular. Encara que en un principi els indicis experimentals indicaven que diferents tipus de CPA influenciarien selectivament la diferenciació de les cèl·lules T, s'ha constatat que tant les cèl·lules dendrítiques com els macròfags o les cèl·lules B, són totes capaces d'induir la producció de cèl·lules Th1 o Th2,

depenent de la presència de les citocines adequades en el microambient. Això no exclou una influència de les diferents CPA en la generació de respostes Th1 o Th2<sup>74</sup>.

Els macròfags, possiblement mitjançant l'acció de la IL-12, afavoreixen la producció d'IFN- $\gamma$  i inhibeixen indirectament la producció de IL-4, mitjançant l'IFN- $\gamma$ <sup>92</sup>. L'IFN- $\gamma$  suprimeix el desenvolupament de cèl·lules productores de IL-4. Alguns treballs indiquen que les cèl·lules Th1 durant el seu desenvolupament perden l'expressió de la segona cadena del receptor del IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  R $\beta$ ), mentre que les Th2 la mantenen. Aquest fenomen explicaria que el IFN- $\gamma$  pugui exercir el seu efecte inhibitori sobre les cèl·lules Th2, afavorint el desenvolupament de respostes tipus Th1<sup>93</sup>. En estudis "in vitro", Secrist *et al*, van demostrar que quan s'utilitzaven limfòcits B com a CPA en cultius de limfòcits d'individus al·lèrgics, estimulats amb al·lèrgen s'afavoria la producció d'IL-4, essent aquesta molt inferior si les CPA eren monòcits<sup>94</sup>.

La capacitat de les cèl·lules dendrítiques per afavorir la producció de respostes Th1 o Th2 sembla ser depenent de factors moleculars de l'antigen i de mediadors inflamatoris i citocines originats durant la reacció inflamatòria, principalment la IL-12<sup>95</sup>. En l'asma al·lèrgica, existeixen abundants cèl·lules dendrítiques en l'epiteli i la submucosa de les vies aèries. En presència del stem-cell factor i de GM-CSF es diferencien, expressant CD1a, MHC de classe II, amb pèrdua progressiva de la seva capacitat de secretar IL-12. Sota la influència de la IL-4 i el TNF- $\alpha$ , expressen Fc $\epsilon$ RI i Fc $\epsilon$ RII incrementant la seva capacitat per actuar com cèl·lules presentadores d'antigen<sup>96</sup>.

L'expressió selectiva d'un determinat tipus de molècules coestimuladores també pot regular la generació de cèl·lules Th1 o Th2. El CD28 i el CTLA-4 són receptors de

les cèl·lules T per a les molècules coestimuladores de la família B7, expressades en les CPA. Les molècules B7-1 (CD80) i B7-2 (CD86) poden expressar-se en cèl·lules B activades, cèl·lules dendrítiques, cèl·lules de Langerhans, monòcits activats i cèl·lules T activades. El B7-2 (CD86) s'expressa constitutivament en cèl·lules dendrítiques i macròfags. Segons diversos autors, el B7-1 (CD80) i el B7-2 (CD86) s'associen amb la inducció de cèl·lules Th1 i Th2, respectivament<sup>97, 98, 99</sup>. La coestimulació d'una altra molècula de recent descripció, el OX40 (molècula membre de la família del receptor del TNF), afavoreix l'expressió d'IL-4 durant el procés d'impromta (priming), i promou la diferenciació de cèl·lules CD4 naive cap a cèl·lules efectores productores d'IL-4<sup>100</sup>.

S'ha investigat l'efecte del grau d'afinitat en la unió entre els complexos MHC/pèptid i el TCR, mitjançant la generació de diversos "pèptids alterats" amb diferents graus d'apetència per aquesta unió; una alta afinitat d'unió afavoreix la generació de clones TH1 mentre aquells que s'uneixen amb baixa afinitat, generen respostes del tipus TH2<sup>101, 102</sup>.

Un altre dels factors implicats en la polarització cap a una resposta tipus Th1 o Th2 és la dosi de l'antigen, si bé en aquest cas els resultats no són concloents, possiblement perquè els estudis s'han desenvolupat amb metodologies experimentals diferents (models murins, antígens parasitaris, etc.). El desenvolupament de respostes Th2 en el context de les malalties al·lèrgiques, ha estat estudiat per diversos investigadors. Carballido i col·laboradors varen mostrar que clones de cèl·lules T d'individus sensibilitzats a la fosfolipasa A2 present en el verí d'himenòpters, produïen més IL-4 quan s'estimulaven amb baixes dosis d'antigen<sup>103</sup>. De forma similar, s'ha descrit que una dosi baixa (0.003-0.001 µg/ml) versus una dosi elevada (10-30 µg/ml) d'al·lergen (*Dermatophagoides*

*pteronyssinus*, pol· len de *Lolium perenne*), induïa una major de producció d'IL -4<sup>94</sup>.

A més de la dosi, la derivació cap a un tipus de resposta Th1 o Th2 també pot dependre de les característiques d'aquest antigen, és a dir si es presenta en forma soluble o particulada. A concentracions baixes de un pèptid antigènic soluble, cada CPA presentaria una baixa densitat de complexos pèptid/MHC. En canvi, a baixes dosis d'un agent infeccios, encara que poques CPA capturin el patogen, cadascuna presentaria una quantitat considerable d'antigen degut a la digestió de la partícula completa. És possible que el nombre de dosis d'IT també pugui influir en aquest canvi immunològic.

#### 1.2.6 CITOCINES TH2 I AL· LÈRGIA

Tant en la inducció de la producció d'IgE com en el desenvolupament de hiperreactivitat bronquial, està ben establert que les citocines que pertanyen al tipus conegut com a Th2 (IL-4, IL-5 i IL-13) hi juguen un paper molt important. Les cèl· lules CD4 Th2 mitjançant la secreció d'aquestes citocines promouen el reclutament, creixement i diferenciació de diferents tipus cel· lulars involucrats en la resposta inflamatòria al· lèrgica. Altres citocines produïdes per les cèl· lules CD4 Th2 humanes, com la IL-6, IL-9 i IL-10, tenen funcions no tan ben caracteritzades.

En la següent taula (Taula 2), es descriuen algunes de les característiques d'aquestes citocines.

## Taula 2. Citocines Th2

<p><b>IL-4</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Indueix la producció de IgE per la cèl. B</li><li>▪ Activa les cèl. endotelials per a l'expressió de molècules d'adhesió que recluten eosinòfils</li><li>▪ Indueix l'expressió de receptors de baixa afinitat de la IgE (CD23)</li><li>▪ Disminueix la producció de IFN-<math>\gamma</math> (citocina tipus Th1)</li><li>▪ Promou la diferenciació de monòcits en cèl. dendrítiques presentadores d'antigen</li></ul> <p><b>IL-13</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Indueix la producció de IgE per la cèl. B</li><li>▪ Indueix l'expressió de receptors de baixa afinitat de la IgE (CD23)</li><li>▪ Activa les cèl. endotelials per a l'expressió de molècules d'adhesió que recluten eosinòfils, basòfils i limfòcits</li><li>▪ És un mediador essencial en l'asma al·lèrgica i la hiperreactivitat bronquial</li></ul> <p><b>IL-5</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Indueix la maduració d'eosinòfils a partir de precursors en la medul·la òssia</li><li>▪ Activa els eosinòfils</li><li>▪ És un factor quimiotàctic per als eosinòfils</li><li>▪ Perllonga la supervivència dels eosinòfils</li></ul>
--

La IL-4 és considerada la principal representant de les citocines Th2 i la principal inductora dels CD4 que produeixen aquest tipus de citocines. Inicialment va ser identificada com a factor de creixement de les cèl·lules B<sup>104</sup>. És produïda per els limfòcits T col·laboradors, mastòcits, basòfils i cèl·lules T citotòxiques. Estimula l'expressió de molècules MHC de classe II, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD40, IgM de superfície i del receptor de baixa afinitat per a la IgE en cèl·lules B, augmentant la capacitat de presentació d'antigen per les cèl·lules B<sup>105</sup>. El seu efecte més destacable és el canvi d'isotip d'IgM a IgE. La producció d'IgE s'inicia amb la transcripció de la cadena pesant  $\epsilon$  induïda per la IL -4, amb la participació de

senyals addicionals com la del CD40, i l'acció sinèrgica d'altres citocines com la IL-2, IL-5 i IL-6 sobre la cèl·lula B<sup>106</sup>. Una altra acció potencialment important de la IL-4 en la inflamació al·lèrgica és la seva capacitat per induir l'expressió de la *molècula d'adhesió cel·lular vascular* (VCAM-1) en les cèl·lules endotelials, la qual és el lligand per al VLA-4. Aquesta unió es traduiria amb una major adhesivitat de l'endoteli per a les cèl·lules T, eosinòfils, basòfils i monòcits, però no per a neutròfils (ja que aquests no expressen VLA-4), la qual cosa és característica de les reaccions al·lèrgiques<sup>107</sup>. L'IFN- $\gamma$  antagonitza el canvi d'isotipus per a la producció d'IgE i l'expressió del receptor de baixa afinitat per a la IgE induïts per la IL-4.

La IL-13 comparteix moltes característiques amb la IL-4. Indueix la producció d'IgE i té un espectre d'activitat similar a la IL-4, si bé no és capaç d'induir el creixement i proliferació de cèl·lules T ni d'induir la generació de cèl·lules Th2 a partir de Th precursors<sup>108</sup>. Tant la IL-4 com la IL-13 utilitzen la cadena IL-4R $\alpha$ , com a component dels seus receptors, i activen vies de senyals intracel·lulars comunes com les *cinases Janus* (Janus kinases o JAK) i la Stat6<sup>109</sup>.

La IL-5 és sintetitzada per cèl·lules T, mastòcits i eosinòfils. Estimula el creixement, diferenciació i activació dels eosinòfils. Perllonga la seva supervivència bloquejant l'apoptosi i actua com a factor quimiotàctic per als eosinòfils. També participa en la diferenciació de cèl·lules B i T, particularment les citotòxiques<sup>110</sup>. Indueix la secreció de mediadors inflamatoris per part dels eosinòfils, augmenta la capacitat citotòxica dependent d'anticossos d'aquestes cèl·lules i és la responsable de la generació dels eosinòfils hipodensos. En models murins, la injecció d'anticossos anti-IL-5 bloqueja el desenvolupament d'eosinofília enfront helmints, i en models animals d'asma, aboleix l'aparició de bronquitis eosinofílica<sup>111</sup>.

La IL-6 és sintetitzada per monòcits, macròfags, fibroblastes, cèl·lules endotelials i cèl·lules T, entre d'altres. Una activitat important és la seva capacitat de estimular



les fases finals de maduració dels limfòcits B i produir immunoglobulines. La IL-9 participa en el desenvolupament de cèl·lules T, megacariòcits, cèl·lules eritropoietiques, i també, en la proliferació de mastòcits<sup>112</sup>.

La IL-10 va ser caracteritzada com a factor generat per cèl·lules Th2 murines que inhibeix la proliferació Th1 i la producció d'IFN- $\gamma$  i d'IL-2<sup>113</sup>. Posteriorment, es va demostrar que la IL-10 també pot ser produïda per limfòcits Th1, inhibint l'expressió d'IL-4 i IL-5 en cèl·lules Th2<sup>114</sup>. Per tant, la seva activitat sembla ser inhibidòria en els processos inflamatoris al·lèrgics<sup>115</sup>. Funciona com a antagonista d'algunes activitats de les citocines i inhibeix l'activitat funcional de macròfags i limfòcits T. Incrementa la proliferació de cèl·lules B i la secreció d'immunoglobulines a través de la disminució de la síntesi de citocines inhibidòries. En humans, els monòcits són probablement la major font de producció de IL-10, encara que també és sintetitzada per limfòcits B, Th0, Th1 i Th2, i cèl·lules NK<sup>116, 117</sup>. El seu efecte inhibitori sobre les cèl·lules T s'ha demostrat en models "in vitro" depenents de la presentació antigènica per CPA, ja que bloqueja el senyal coestimulador del CD28, l'expressió del MHC II i la ICAM-1<sup>116, 118, 119, 120</sup>. Per la seva acció inhibidòria de la síntesi de citocines proinflamatòries, s'ha suggerit que la IL-10 pot inhibir processos inflamatoris mediat per cèl·lules Th1, i pot ser que tingui un paper en la inducció i manteniment de tolerància a l'al·lèrgen en determinades circumstàncies.

### 1.2.7 REGULACIÓ DE LA SÍNTESI D'IMMUNOGLOBULINA E

La IgE és sintetitzada pels limfòcits B. La regulació d'aquesta síntesi depèn fonamentalment de les cèl·lules T activades i de les substàncies solubles secretades per aquestes cèl·lules. Tal com és típic en una gran varietat de respostes immunitàries, la regulació de la síntesi de IgE és un procés altament coordinat mitjançant el correcte equilibri entre els senyals estimuladors i reguladors.

La IL-4 i la IL-13 són les citocines més importants que indueixen la producció de IgE.

Igual que en la resta de reaccions immunològiques, en la reacció al·lèrgica és produeix una activació específica de la cèl·lula T mitjançant la presentació de l'antigen per les CPA. Les CPA (macròfags, monòcits, cèl·lules B, cèl·lules dendrítiques, etc.) són les encarregades de la captació i processament de l'al·lergen que penetra en l'individu. Un cop captat, aquest s'interioritza mitjançant endocitosis, formant una vesícula. En unir-se-li lisosomes que contenen enzims proteolítics, es produeix la fragmentació de l'antigen. Posteriorment, mitjançant exocitosis, els pèptids antigènics processats són exterioritzats en el context de les molècules del complex major d'histocompatibilitat (MHC) de classe II i són presentats a la cèl·lula Th2, en el teixit limfàtic. Un cop activat el LTh2, es produeix la maduració i expansió clonal del LTh2 al·lergen específic.

Una mateixa cèl·lula B pot produir els diferents isotips de cadenes pesants que comparteixen la mateixa regió variable VDJ. El canvi d'isotips o *isotype switching*, es produeix mitjançant un procés de recombinació genètica. Aquesta recombinació no és un procés que es produeixi a l'atzar, sinó que està controlat per mitògens i limfocines, especialment les que són produïdes per les clones al·lergen - específiques de limfòcits CD4+ tipus Th2.

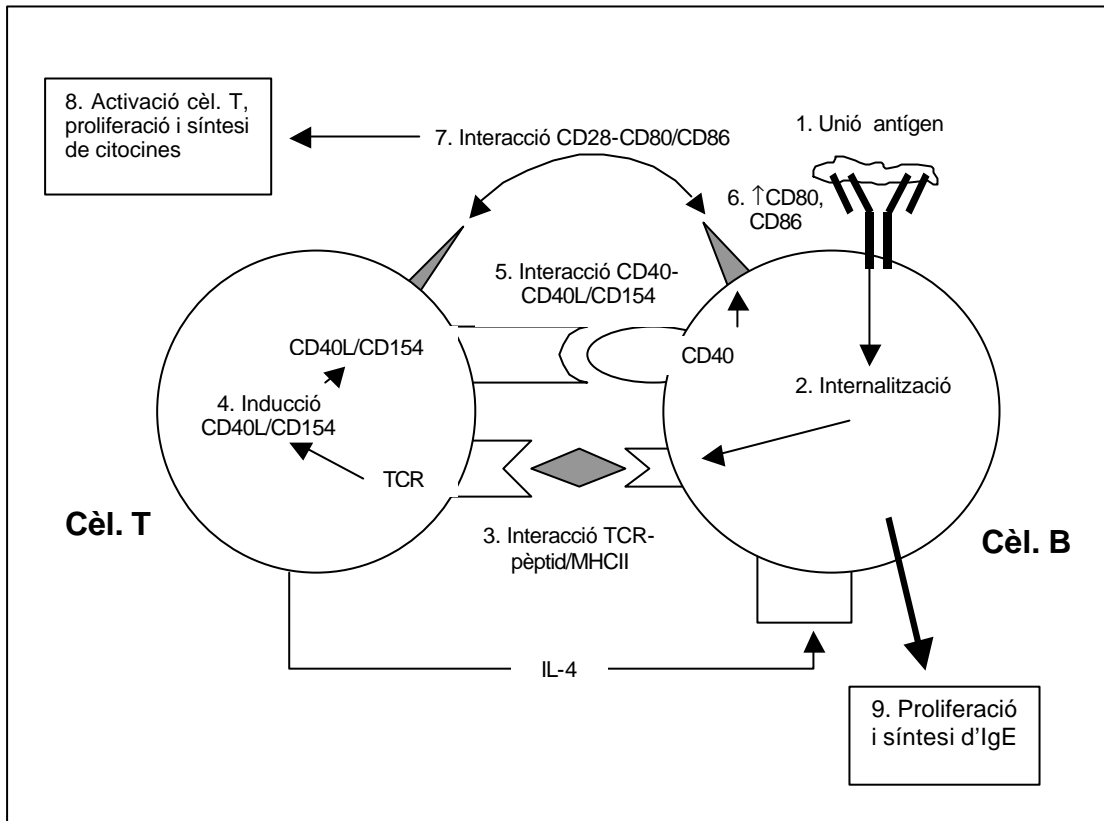
S'accepta un model de doble senyal per a la inducció de la síntesi de IgE per part de la cèl·lula B. Ambdós senyals són generats per la cèl·lula T, que mitjançant una complexa sèrie d'interaccions, actuen sobre la cèl·lula B. El primer *senyal* és dependent de citocines, com la IL-4 o la IL-13, produïdes per cèl·lules T (tipus Th2), mastòcits i basòfils. Indueix la transcripció dels gens C $\epsilon$ , determinant l'especificitat d'isotip. L'observació que els ratolins que manquen d'IL-4 no produeixen IgE, inclús després de la infecció per paràsits, evidencia el paper crucial de la IL-4 en aquest

procés<sup>121</sup>. De forma similar, en experiments amb ratolins que manquen de la Stat 6, un factor de transcripció involucrat en la transducció del senyal de la IL-4, també es mostren incapaços de produir IgE<sup>122</sup>. La IL-13, també produïda per les cèl·lules Th2 mostra una activitat similar a la IL-4, incloent la seva habilitat per a induir la síntesi d'IgE<sup>52</sup>.

El segon *senyal* o *senyal co-estimulador*, depèn de molècules de CD40 expressades a la superfície del limfòcit B i activa la recombinació de DNA. La unió del CD40-ligand (CD40L o CD154) de la superfície del limfòcit T activat, al CD40 de la membrana del limfòcit B, és necessària per a la producció del RNA madur del C $\epsilon$ . L'interferó gamma (IFN- $\gamma$ ) en canvi, bloqueja la síntesi d'IgE en inhibir la transcripció de la cadena C $\epsilon$ <sup>123</sup>. La importància de la interacció entre el CD40 i el CD40L/CD154 és evident per la greu immunodeficiència manifestada per els individus amb una mutació del CD40L/CD154; aquests individus presenten infeccions bacterianes de repetició secundàries a la virtual absència d'IgA, IgG i IgE, amb absència de centres germinals als ganglis limfàtics, i nivells elevats d'IgM<sup>24</sup>.

Una CPA, com per exemple una cèl·lula B que expressa IgM específica per a l'antigen (que posteriorment pot ser una IgE), capta l'antigen mitjançant molècules de superfície, el processa i el presenta a una cèl·lula TH2 antigen-específica, en el context de molècules MHCII presents en la cèl·lula B. El reconeixement pel complex TCR/CD3 se segueix d'una sèrie d'interaccions entre molècules complementàries expressades en les cèl·lules T i B. Les molècules de CD40, expressades constitutivament en les cèl·lules B, s'uneixen al ligand del CD40 (CD40L), també conegut com a CD154, de les cèl·lules T, induint l'expressió de molècules accessòries, com les B7, en cèl·lules B. El CD80 i el CD86 (també coneguts com a B7-1 i B7-2, respectivament), presents en la superfície de la CPA, interactuen amb el CD28 de la cèl·lula T, induint una elevada secreció de IL-4, i

també de IL-5. La IL-4 s'uneix al receptor heterodímic de la IL-4 (IL-4R). Així la cèl·lula B rep els dos senyals requerits per al canvi d'isotip a IgE: la IL-4 provoca la transcripció de la  $C_{\epsilon}$  i la unió CD40-CD40L activa la recombinació del DNA, donant lloc a la síntesi de IgE (Fig. 8).



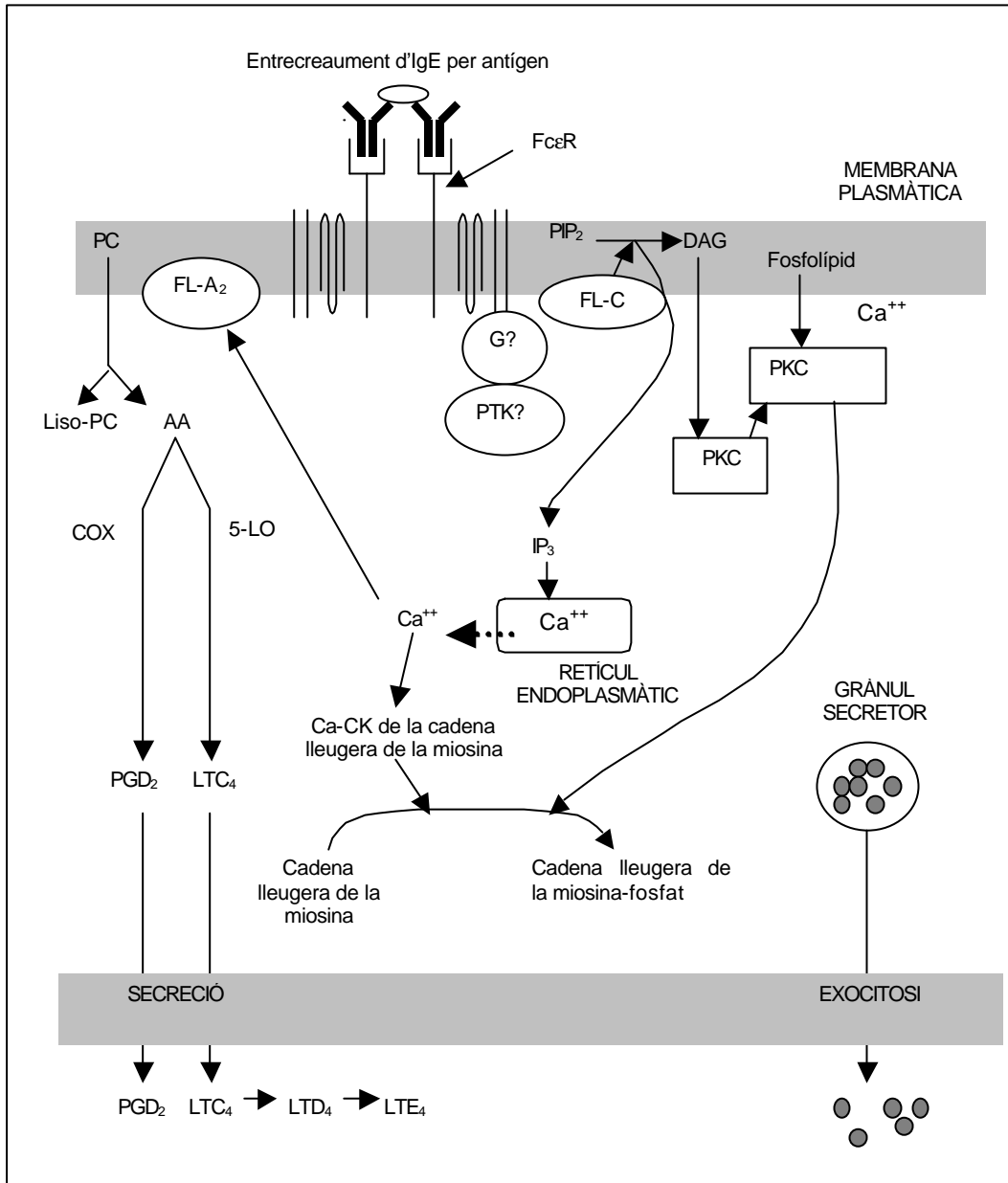
**Figura 8. Interaccions entre les cèl·lules T i B en la síntesi d'IgE**

### 1.2.8 ACTIVACIÓ DE BASÒFILS I MASTÒCITS

Un cop sintetitzada, la IgE s'uneix a receptors específics expressats en la superfície de determinades cèl·lules, tal com els mastòcits i els basòfils. Encara que es tracta de dos tipus cel·lulars diferents, comparteixen algunes característiques com l'expressió de receptors d'alta afinitat per a la IgE i la seva participació en la reacció al·lèrgica amb l'alliberament de mediadors. La sensibilització d'un individu a un al·lergen, comporta la síntesi d'anticossos IgE específics que s'uneixen als receptors de la superfície de basòfils i mastòcits. L'activació immunològica

d'aquestes cèl·lules s'inicia quan molècules de IgE unides al receptor FcεRI són entrecreuades per la interacció amb l'al·lèrgen multivalent, formant-se ponts entre els complexos molècules de IgE/receptor. Els canvis que es produeixen a l'interior de la cèl·lula encara no són totalment coneguts. A nivell bioquímic, el primer canvi involucrat en la transducció del senyal, inclou la fosforilació de les cadenes β i γ del FcεRI. De forma general, la reacció bioquímica de fosforilació de proteïnes de membrana freqüentment té lloc en unes seqüències d'aminoàcids coneguts com *motiu tirosina activador d'immunoreceptor* (immunoreceptor tyrosine activation motif o ITAM) presents en múltiples receptors. Aquestes seqüències són presents a les cadenes β i γ del FcεRI. Els ITAMs s'associen a proteïn cinases, a les quals activen. Les proteïn cinases activades fosforilen residus tirosina en els ITAMs i fosforilen i activen en cascada molècules efectores com la fosfolipasa C, el Ras i la fosfatidil inositol-3 cinasa<sup>125</sup>.

S'inicia una cascada enzimàtica en la que la fosfolipasa C hidrolitza el fosfatidil inositol a inositol trifosfat i a diacilglicerol. L'inositol trifosfat actua com a segon missatger mobilitzant el calci (Ca<sup>++</sup>) intracitoplasmàtic, i junt amb el diacilglicerol, en presència de Ca<sup>++</sup>, activen la proteïn cinasa C, que facilita la fusió de les bicapes lipídiques i dona lloc a l'exocitosi i secreció dels grànuls preformats<sup>126</sup>. Aquesta activació també indueix la formació de leucotriens i prostanoïdes a partir dels lípids de membrana (Fig. 9).



**Figura 9. Activació del mastòcit**

PTK= proteín cinasa; G= proteïna lligadora de la guanosina trifosfat; FL -C= fosfolipasa C; FL-A= fosfolipasa A; PKC= proteín cinasa C; PIP<sub>2</sub>= fosfatidilinositol; DAG= diacilglicerol; IP<sub>3</sub>=inositol trifosfat; Ca-CK= calci-modulín cinasa; PC= fosfatidilcolina; COX= cicloxigenasa; 5-LO= 5-lipoxigenasa; PG= prostaglandina; LT= leucotriè.

A més d'alliberar aquests mediadors inflamatoris, els mastòcits i els basòfils participen en la regulació de la resposta immunològica al·lèrgica secretant diverses citocines

### 1.2.8.1 MEDIADORS DE MASTÒCITS I BASÒFILS

Els basòfils sanguinis i els mastòcits tissulars produeixen i secreten els mediadors que inicien les respostes humoral i cel·lulars inflammatòries de les reaccions d'hipersensibilitat immediata. Els basòfils poden passar de la circulació als teixits durant el procés inflamatori. Els mastòcits habitualment es troben en els teixits per on poden penetrar les substàncies externes i on s'inicia típicament la reacció al·lèrgica (mucosa respiratòria, digestiva, etc.).

Segons el seu contingut en proteases, s'han descrit dos tipus de mastòcits. Els *mastòcits T* contenen només triptasa, i són els predominants en el pulmó, especialment en els alvèols, i en la mucosa del budell prim. Els *mastòcits TC*, contenen quimasa, carboxipeptidasa, catepsina G i triptasa, i són el tipus predominant a la pell i a la submucosa gastrointestinal<sup>125</sup>.

Els mediadors que alliberen els mastòcits i els basòfils s'enumeren a la Taula 3.

**Taula 3. Mediadors de mastòcits i basòfils**

Mediador	Mastòcit TC	Mastòcit T	Basòfil
<b>Preformats (grànuls)</b>			
Histamina	++	++	++
Triptasa	++	++	+/-
Quimasa	++	-	-
Carboxipeptidasa	++	-	-
Catepsina G	++	-	-
Heparina	+	+	-
Condroitín sulfat E	+	+	-
Condroitín sulfat A			+
<b>Generats "de novo"</b>			
- Metabolits de l'àcid araquidònic			
<i>Metabolits de la lipooxigenasa</i>			
LTC4	++	++	++
LTB4	+	+	+
<i>Metabolits de la ciclooxigenasa</i>			
PGD2	++	++	-
- Citocines			
TNF- $\alpha$	++	++	++
IL-5, IL-6, IL-9	+	++	++
IL-4	+	+	++
IL-13	++	++	+

### 1.2.8.1.1 Histamina

La histamina és una amina formada a partir de la histidina per acció de la histidín descarboxilasa, present en mastòcits i basòfils. S'emmagatzema en grànuls citoplasmàtics, on gràcies a la influència del pH àcid, s'uneix a grups carboxil i sulfat de proteïnes i proteoglicans. Durant la degranulació es solubilitza en neutralitzar -se el pH. Quan s'allibera, té potents efectes espasmògens al múscul llis i efectius



vasoactius, i és metabolitzada ràpidament, en pocs minuts.

La histamina actua als seus receptors específics H1, H2 i H3, presents en diferents tipus cel·lulars, i exercint diferents accions, segons el tipus de receptor implicat:

- En els receptors H1 (pell, múscul llis, etc.) produeix permeabilitat venular, vasodilatació, contractilitat del múscul llis intestinal i bronquial i secreció de moc a les mucoses. L'augment de la permeabilitat vascular pot jugar un paper important per a què diferents factors plasmàtics arribin al focus inflamatori per exercir la seva acció.
- Sobre els receptors H2 (estómac, pulmó, limfòcits, etc.), la histamina indueix la secreció gàstrica d'àcid clorhídric. També s'han descrit diversos efectes immunomoduladors: inhibició de la secreció de mediadors per part de limfòcits citotòxics i granulòcits, augment de l'activitat supressora de limfòcits T<sup>127</sup>, augment de la permeabilitat epitelial a les vies aèries<sup>128</sup>, estimulació de la quimiocinesi de neutròfils i eosinòfils i de l'expressió de receptors en eosinòfils per al C3b, supressió de la quimiotaxi d'eosinòfils<sup>129</sup> i activació de l'alliberament de PGI<sub>2</sub> (prostaciclina) per les cèl·lules endotelials.
- L'estimulació dels receptors H3 té efectes a nivell de neuroconducció i neuroexcitabilitat, i podrien intervenir en la hiperreactivitat bronquial neurogènica.

#### **1.2.8.1.2 Proteases neutres**

Les proteases neutres són enzims que escindeixen unions peptídiques a un pH neutre. Inclouen: triptasa, quimasa, catepsina G i carboxipeptidasa.

La *triptasa* és una serín endopeptidasa present en mastòcits T i TC, però que quasi

no es troba en basòfils. Per això la seva determinació en diversos fluids biològics (plasma, secrecions nasals, bronquials, etc.) s'utilitza com a marcador de l'activació de mastòcits<sup>130</sup>. S'acumula en forma de grànuls citoplasmàtics en forma tetramèrica activa. S'estabilitza mitjançant l'unió a heparina. Les seves propietats "in vitro" es correlacionen amb diversos efectes biològics: inactiva el fibrinogen com a substrat coagulable de la trombina<sup>131</sup>, afavoreix l'efecte contràctil de la histamina sobre el múscul llis<sup>132</sup>, degrada el neuropèptid broncodilatador pèptid intestinal vasoactiu (VIP), i estimula la mitogènesi de cèl·lules de múscul llis<sup>133</sup> i fibroblasts<sup>134</sup>.

La *quimasa* és un enzim amb activitat quimiotripsina-like, present en els mastòcits cutanis. Igual que la triptasa, s'uneix a heparina i condroitín sulfat E i s'emmagatzema en forma activa en els grànuls citoplasmàtics, encara que la seva estabilitat no depèn d'aquesta unió. Entre les seves accions destaquen l'activació de l'angiotensina I<sup>135</sup> i de la procol·lagenasa<sup>136</sup>, ataca la membrana basal de la unió dermoepidèrmica<sup>137</sup>, degrada diversos neuropèptids<sup>138</sup>, i promou la secreció glandular de moc<sup>139</sup>.

La *catepsina G* és una altra proteasa neutra de la classe serina, que es troba en mastòcits, neutròfils i mastòcits.

La *carboxipeptidasa* es troba, junt amb la quimasa i la catepsina G, en els grànuls secretors dels mastòcits TC.

#### **1.2.8.1.3 Proteoglicans**

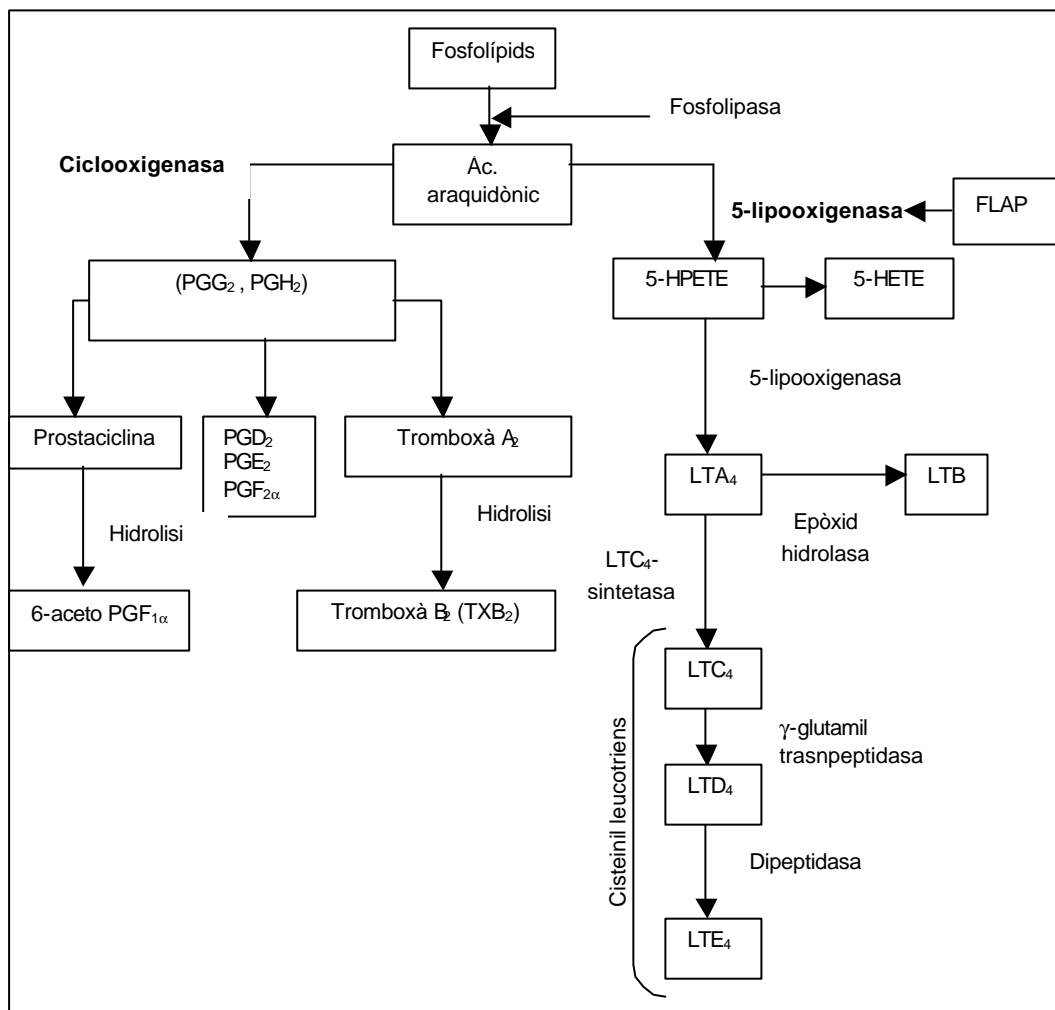
L'heparina i el *condroitín sulfat E* són els proteoglicans que es troben en els mastòcits, mentre que el *condroitín sulfat A* és característic dels basòfils. Són els responsables de la metacromàsia d'aquestes cèl·lules quan es tenyeixen amb tincions bàsiques. S'uneixen a la histamina, proteases neutres i hidrolases àcides en el pH àcid dels grànuls secretors. Tenen a més activitat anticoagulant,

anticomplement i anticalicreïna. L'heparina participa en l'activació dels precursors de la quimasa i la triptasa, i pot neutralitzar la proteïna major de l'eosinòfil.

#### 1.2.8.1.4 Mediadors lipídics de nova síntesi

L'activació dels mastòcits a través de senyals de membrana, indueix l'activació de la fosfolipasa A que hidrolitza els fosfolípids de membrana, originant àcid araquidònic (AA). Aquest es metabolitza per dues vies: la de la ciclooxigenasa dona lloc a *prostaglandines* i *tromboxans* i la de la lipooxigenasa origina els *leucotriens* (LT) (Fig. 10).

Per la via de la lipooxigenasa, activada per la proteïna activadora de la lipooxigenasa (FLAP), es formen el LTB<sub>4</sub> i els cisteinil-leucotriens (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> i LTE<sub>4</sub>). Aquests últims es coneixien també com a *substància de reacció lenta de l'anafilaxi* (SRS-A). El LTB<sub>4</sub> té una activitat proinflamatòria. Augmenta l'adherència dels leucòcits a l'endoteli<sup>140</sup>, és quimiotàctic per neutròfils i eosinòfils<sup>141</sup> i provoca broncoconstricció mitjançant l'acció del tromboxà A<sub>2</sub><sup>142</sup>. Els cisteinil-leucotriens incrementen la permeabilitat vascular<sup>143</sup>, són vasoconstrictors<sup>144</sup> i potents broncoconstrictors<sup>145</sup> i augmenten la secreció de moc<sup>146</sup>.



**Figura 10. Mediadors lipídics de nova síntesi**

FLAP=Proteïna activadora de la lipooxygenasa; LT=leucotriè; 5-HPETE=Àcid 5-hidroxeicosatetraènic; 5-HETE=Àcid 5-hidroxeicosatetraènic; PG=prostaglandina.

La via de la ciclooxygenasa (COX) dona lloc als *prostanoides* que són productes derivats de l'àcid araquidònic, que inclouen prostaglandines, prostaciclina i tromboxans. La COX, també coneguda com a *prostaglandín H sintasa*, és l'enzim que inicia la metabolització de l'àcid araquidònic en aquesta via. Existeix en dues formes: la COX1 expressada constitutivament en la majoria dels teixits dels mamífers i que regula la producció de prostanoides en la funció cel·lular normal, i la COX2, que és induïble en situacions d'inflamació tissular i respostes

mitogèniques<sup>147</sup>. Alguns dels productes resultants de la via de la ciclooxigenasa, com és el cas de les prostaglandines (PG), poden presentar efectes antagònics a nivell de pulmó. La PGD<sub>2</sub> té una potent activitat broncoconstrictora, més que la PGF<sub>2α</sub> i la histamina. En canvi la PGE<sub>2</sub> té una acció broncodilatadora i antagonitza amb altres prostanoides. La prostaciclina o PGI<sub>2</sub> és una potent substància bronco i vasodilatadora.

Sembla clar que els leucotriens juguen un paper important en les reaccions al·lèrgiques, especialment en l'asma bronquial i la rinitis, en la seva fase tardana, mentre que els prostanoides tindrien una actuació significativa en la fase immediata. L'aparició dels nous tractaments antiasmàtics basats en la seva activitat anti-leucotriens, permetran entendre la seva significació clínica.

El *factor activador de plaquetes* (PAF) és un altre derivat lipídic alliberat per basòfils i altres cèl·lules com eosinòfils, macròfags, cèl·lules endotelials i neutròfils. De fet, es tracta d'una família de fosfolípids estructuralment relacionats amb activitat estimuladora de plaquetes, neutròfils i eosinòfils. És un potent factor proinflamatori i broncoconstrictor, probablement mediat per altres compostos com els cisteinil-leucotriens<sup>147</sup>.

### 1.2.9 EOSINÒFILS I INFLAMACIÓ

La reacció immunològica al·lèrgica, s'inicia com a una resposta d'hipersensibilitat immediata, que després d'unes hores se segueix d'una fase tardana que es caracteritza per un procés inflamatori. En aquesta fase, induïda per substàncies secretades en la fase immediata, participen mediadors com els leucotriens i les citocines, i també diferents tipus cel·lulars destacant entre ells els eosinòfils.

A part de la seva participació en processos inflamatoris, on poden produir lesió

tissular i causar malalties, cal destacar la seva funció en la defensa enfront helmints, participant activament en la seva destrucció com a cèl·lules tòxiques efectores.

Els granulòcits eosinòfils es desenvolupen i maduren al moll d'ós a partir de precursors, en resposta a l'acció de la IL-5. L'efecte sinèrgic de la IL-5 amb la eotaxina mobilitza els eosinòfils cap als vasos sanguinis<sup>148</sup>. Per la interacció entre molècules d'adhesió de l'endoteli vascular com la molècula d'adhesió endotelial vascular (VCAM-1), que són induïdes per la IL-4 i la IL-13, i molècules de l'eosinòfil (p-selectina i l'antigen d'activació molt tardana o very late activation antigen VLA-4) s'inicia l'enlentiment de la circulació dels eosinòfils, el seu anclatge i rodament. Després s'incrementa aquesta adhesió, per la interacció entre  $\beta_1$  i  $\beta_2$ -integrines de l'eosinòfil i molècules d'adhesió intercel·lular (ICAM) de l'endoteli. L'eosinòfil inicia la diapedesi i posteriorment, amb la interacció de molècules VLA-4 i VLA-6 de l'eosinòfil amb proteïnes de la matriu del teixit connectiu (fibronectina, la minina) passa al teixit perivascular. L'activació dels eosinòfils s'inicia per l'acció de diversos factors (IL-5; quimiocines com RANTES i eotaxina; mediadors lipídics com el factor d'activació plaquetar o PAF), i migren cap al seu destí. Per l'acció de citocines, mediadors lipídics, immunoglobulines, fragments del complement i  $\beta_2$ -integrines, degranulen i secreten mediadors tòxics<sup>149</sup>.

Entre els mediadors produïts pels eosinòfils destaquen la proteïna principal bàsica (MBP), la peroxidasa de l'eosinòfil (EPO), la proteïna catiònica de l'eosinòfil (ECP), la neurotoxina derivada de l'eosinòfil (EDN) i l'homòleg de la proteïna principal bàsica (MBPH), mediadors lipídics, metabolits de l'oxigen, proteases i citocines<sup>150</sup>. La toxicitat d'aquestes substàncies pot donar lloc a alteracions estructurals com descamació de l'epiteli respiratori, alteració de l'activitat ciliar, augment de les secrecions i augment de la permeabilitat vascular, que s'acompanyen d'una

alteració en la reactivitat bronquial.

Les respostes efectores de l'eosinòfil contribueixen en reaccions fisiològiques i patològiques que cursen amb eosinofília, com són les malalties al·lèrgiques respiratòries, especialment en la seva fase crònica. S'ha descrit una elevació dels productes de degranulació dels eosinòfils, tal com la ECP, en fluids biològics i teixits en aquestes malalties.

## **1.3 ASMA AL·LÈRGICA**

### **1.3.1 ASMA**

Malgrat que l'asma va ser reconeguda com a malaltia en les civilitzacions antigues fa milers d'anys, no és senzill definir-la. Aquesta dificultat radica en què no existeixen elements claus inequívocs, com un agent causal únic o un paràmetre biològic discriminant. Els seus símptomes més típics, com els sibilants, la tos o la dispnea, formen part de les manifestacions de moltes altres malalties. Hi ha hagut innombrables intents d'arribar a una definició de l'asma. Una de les més acceptades és la del grup Global Initiative for Asthma (GINA), elaborada per un equip internacional d'experts en aquesta patologia<sup>151</sup>:

Segons la definició del GINA, "l'asma és una alteració inflamatòria crònica de les vies aèries en la qual hi participen moltes cèl·lules, especialment mastòcits, eosinòfils i limfòcits T. En individus susceptibles, aquesta inflamació provoca episodis recurrents de sibilants, dispnea, opressió toràcica i tæ, especialment durant la nit o de matinada. Aquests símptomes s'associen habitualment amb una limitació generalitzada, encara que variable, del flux aeri, què és, al menys parcialment, reversible de forma espontània o amb tractament. La inflamació també causa un augment de la hiperreactivitat bronquial associada, front a diversos estímuls".

Cal remarcar que aquesta definició inclou característiques clíniques i histopatològiques, i destaca el caràcter inflamatori crònic de la malaltia.

### **1.3.2 CLASSIFICACIÓ CLÍNICO-FUNCIONAL DE L'ASMA**

Segons la intensitat i freqüència dels símptomes i de les alteracions en les proves de funció respiratòria, el grup del GINA<sup>151</sup> ha establert unes categories de gravetat



de l'asma que queden reflectides en la Taula 4.

**Taula 4. Classificació de la gravetat de l'asma**

Frequència	Gravetat	Síntomatologia clínica	Obstrucció bronquial
<b>Intermitent</b>	<b>Lleu</b>	Síntomes breus, d'aparició inferior a 1-2 cops per setmana Síntomes nocturns menys de 2 cops al mes Pacient asimptomàtic entre els períodes d'exacerbació	VEMS igual o superior al 80% del teòric Variabilitat del VEMS inferior al 20% VEMS normal després de tractament broncodilatador
<b>Persistent</b>	<b>Lleu</b>	Síntomes breus, d'aparició 2 o més cops per setmana, però menys d'un cop al dia Síntomes nocturns més de 2 cops al mes Les exacerbacions poden alterar l'activitat física i la son	VEMS igual o superior al 80% del teòric Variabilitat del VEMS 20-30% VEMS normal després del tractament broncodilatador
<b>Persistent</b>	<b>Moderat</b>	Síntomes diaris Síntomes nocturns un cop a la setmana Les exacerbacions poden alterar l'activitat física i la son	VEMS entre el 60-80% del teòric Variabilitat del VEMS superior al 30% VEMS normal després del tractament broncodilatador
<b>Persistent</b>	<b>Greu</b>	Síntomes continus Síntomes nocturns freqüents, quasi diaris Exacerbacions freqüents amb important limitació de l'activitat física i de la son	VEMS igual o inferior al 60% del teòric Variabilitat del VEMS superior al 30% VEMS inferior al valor normal malgrat el tractament

### 1.3.3 CLASSIFICACIÓ ETIOPATOGÈNICA DE L'ASMA

Tradicionalment s'ha dividit la malaltia asmàtica en *asma intrínseca* o *no al·lèrgica* i *asma extrínseca* o *al·lèrgica*. Hi ha discrepàncies entre diversos autors referent a si aquestes dues formes d'asma són malalties diferents o no, ja que moltes troballes d'anatomia patològica, així com de citocines, quimiocines, mediadors, etc. són similars. No obstant clínicament es corresponen a les següents característiques:

- Asma extrínseca: comença generalment a l'infantesa o l'adolescència, hi ha antecedents familiars d'asma o d'atòpia, s'acompanya d'altres malalties atòpiques com rinitis al·lèrgica o dermatitis atòpica, i les proves cutànies d'hipersensibilitat immediata són positives.
- Asma intrínseca: comença generalment en l'edat adulta, no hi ha habitualment antecedents personals ni familiars d'atòpia, les proves cutànies d'hipersensibilitat immediata són negatives, i tendeix a ser persistent amb obstrucció del flux aeri. En ocasions s'acompanya de poliposi nasal o d'intolerància als antiinflamatoris no esteroideos.

Aquesta dicotomia no és absoluta, i si bé alguns pacients es corresponen clarament a un dels tipus, molts tenen característiques d'ambdós.

#### 1.3.4 FACTORS CAUSALS EN L'ASMA

No existeix un factor causal únic en l'asma, però sí que s'han identificat una sèrie de condicions que afavoreixen la seva aparició. Aquests condicionants poden ser de tipus endogen, com els determinants hereditaris, o de tipus exogen, com l'exposició a al·lèrgens o contaminants ambientals.

##### 1.3.4.1 GENÈTICA I DETERMINANTS PRENATALS D'ASMA I ATÒPIA

L'atòpia és el factor de risc més important per al desenvolupament de l'asma, incrementant el risc de patir asma entre 10 i 20 vegades comparat amb la població no atòpica. Ja que tant l'atòpia com l'asma tenen una tendència de presentació familiar, s'han estudiat diferents gens i regions cromosòmiques que es relacionen amb la seva herència (Taula 5)<sup>152</sup>. Entre d'altres, s'ha descrit una associació entre

els nivells d'IgE sèrica total i/o atòpia amb els cromosomes 5q, 11q i 12q<sup>153</sup>.

Nombrosos treballs mostren que el fenotip atòpic ja pot expressar-se abans del naixement<sup>154,155</sup> i que limfòcits T de sang de cordó de nounats fills de mares atòpiques, ja responen enfront antígens, inclús enfront aeroal·lergens<sup>156</sup>.

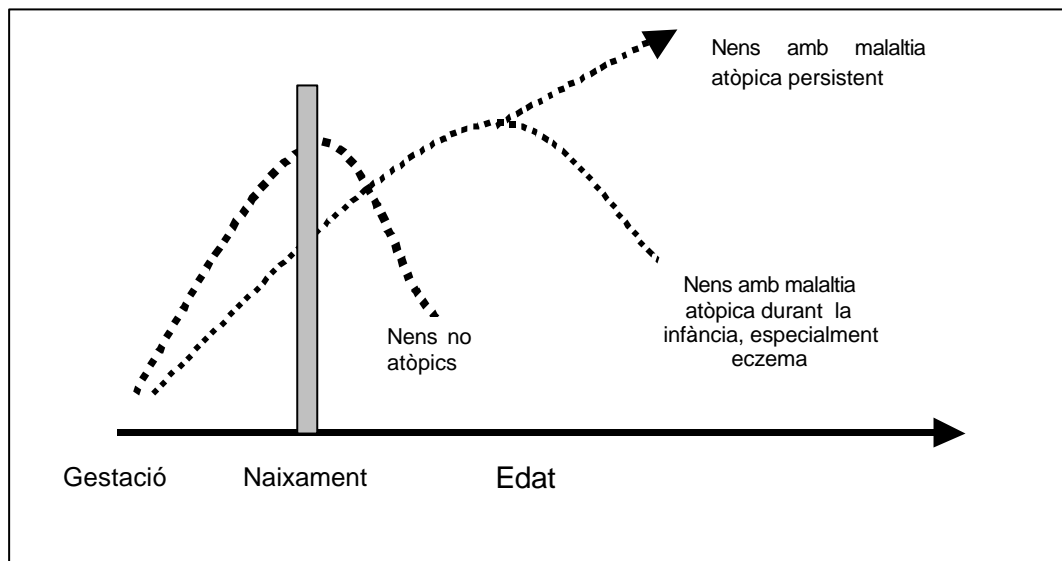
**Taula 5 . Locus cromosòmics relacionats amb l'asma i l'atòpia**

<b>Locus cromosòmic</b>	<b>Candidat/s</b>	<b>Funció</b>
<b>2q</b>	CD28	Proliferació de cèl·lula T
<b>3p</b>	"Cluster" de quimiocines	Reclutament de cèl·lules T i macròfags
<b>5q31</b>	IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, GM-CSF	Citocines que incrementen la funció IgE-depenent de mastòcits, basòfils i eosinòfils
<b>5q32</b>	Receptor $\beta_2$ -adrenèrgic (polimorfismes 16 i 17)	Broncodilatació
<b>6p</b>	Complex HLA	Presentació antígen
<b>6p21.3</b>	TNF $\alpha$ (polimorfismes, p. ex. LT $\alpha$ Ncol)	Citocina inflamatòria pleiotròpica
<b>11q13</b>	Fc $\epsilon$ RI (polimorfisme E237G)	Transducció de senyal en mastòcits, basòfils i cèl·lules Dendrítiques
<b>12q</b>	IFN- $\gamma$	Inhibició de cèl·lules tipus Th2
<b>12q</b>	Forma constitutiva de sintetasa d'òxid nítric, factor de creixement de mastòcits	Mediadors d'inflamació
<b>13q</b>	Proteïna D esterasa	Funció desconeguda
<b>14q</b>	Complex $\alpha/\gamma$ TCR	Activació cèl·lules T

En els nens atòpics, alguns autors han demostrat una capacitat disminuïda en la producció de IFN- $\gamma$  per part de cèl·lules mononuclears (CMN) de sang perifèrica en

resposta a estimulació antigen-específica<sup>157</sup>. Aquest increment relatiu en les citocines tipus Th2 condicionaria el fenotip al·lèrgic. Es desconeixen les bases moleculars d'aquesta alteració, encara que podria estar involucrada una producció deficient de IL-12 o IL-18, que regulen el IFN- $\gamma$ , o un defecte en el control de l'expressió del gen de l'IFN- $\gamma$ .

L'embaràs normal, es caracteritza per l'absència d'una reacció immunitària cel·lular contra el fetus per part de la mare, per la qual cosa s'ha suggerit que la gestació seria una situació amb predomini d'una resposta immune tipus Th2<sup>158,159</sup>. De fet, la progesterona afavoreix el desenvolupament de cèl·lules tipus Th2 humanes<sup>160</sup>. S'ha demostrat que l'epiteli de l'amni humà produeix IL-4<sup>161</sup> i s'ha descrit la presència de mRNA per a IL-10 en el teixit placentari humà a terme<sup>162</sup>. S'ha suggerit que "in vivo" l'ambient immunològic en el que es desenvolupa el fetus és de tipus Th2. En general, un predomini de resposta Th2 als al·lèrgens és comú des del moment del naixement i normalment en els primers anys de la vida hi ha una desviació cap a l'expressió de citocines Th1 i a la producció d'anticossos IgG (Fig. 11), particularment de la subclasse IgG1. Aquesta modificació immunològica sembla tenir lloc més fàcilment en resposta a al·lèrgens alimentaris que per a inhalants, i en nens no atòpics més que en atòpics<sup>163</sup>. Alguns treballs indiquen que la tendència a desenvolupar asma i malalties al·lèrgiques es deuria a una deficient maduració dels limfòcits, particularment els tipus Th1, possiblement per un defecte per part de la IL-12 i/o el IFN- $\gamma$  en el "tancament" d'aquesta finestra immunològica<sup>164</sup>.



**Figura 11. Resposta Th2 abans i després del naixement**

#### 1.3.4.2 FACTORS AMBIENTALS

La majoria de treballs epidemiològics fets en els darrers anys descriuen un augment en l'incidència de malalties al·lèrgiques, especialment l'asma al·lèrgic. Possiblement canvis en l'estil de vida de la població (sedentarisme, increment del temps passat en l'interior d'edificis, habitats menys ventilats, etc.), augmenta l'exposició a al·lèrgens d'interior, i pot contribuir en l'increment de la prevalença o morbiditat de l'asma<sup>165</sup>. Aquests canvis també queden reflectits en l'exposició a una major contaminació ambiental, canvis en els hàbits d'higiene, etc.

##### 1.3.4.2.1 Al·lèrgens

Existeix un increment documentat de l'asma, a expenses bàsicament de l'asma perenne, i en gran proporció de casos existeix una sensibilització a al·lèrgens domèstics comuns com a àcars de la pols, epiteli de gos o gat, cuques molles, etc. S'ha demostrat una relació dosi-resposta entre l'exposició a al·lèrgens dels àcars de la pols i la sensibilització als seus antígens<sup>166</sup>. En nens atòpics (definites per la

presència d'antecedents familiars d'atòpia i proves cutànies positives a al·lergens d'exterior), existeix un llindar de sensibilització d'1 µg d'al·lergen del grup I d'àcars per gram de pols<sup>167</sup>. L'exposició a al·lergens durant els tres primers anys de vida sembla ser molt important per a estimular la sensibilització en el tracte aeri inferior<sup>168</sup>. Cal afegir, que cada cop es descriuen noves fonts d'al·lergens d'interior, com poden ser les plantes ornamentals.

A l'àrea geogràfica de Catalunya, els al·lergens més freqüents als quals està sensibilitzada la població són els àcars de la pols, seguits de pol·len de gramínies (zones d'interior) i *Parietaria judaica* (zona costanera), epitelis d'animals i fongs de la humitat<sup>169</sup>.

#### **1.3.4.2.2 Infeccions**

En els darrers anys alguns autors han proposat el que es denomina “teoria de la higiene” segons la qual, la menor exposició de l'individu a microorganismes, els canvis en l'alimentació infantil, l'ús d'antibiòtics i les vacunacions, haurien induït una sèrie de modificacions en el sistema immunitari que afavoririen el predomini d'una resposta tipus Th2, i conseqüentment, el desenvolupament de malalties al·lèrgiques. Aquest efecte “col·lateral” no implica que els antibiòtics o les immunitzacions no siguin útils, ja que és evident que el seu ús és imprescindible per prevenir i tractar malalties greus.

Alguns estudis han demostrat que les infeccions tenen efectes sistèmics inespecífics a llarg termini sobre la resposta immune enfront antígens no relacionats<sup>170</sup>. Un exemple és un estudi efectuat en els nens de Guinea-Bissau en el que s'observava que després d'una infecció pel virus del xarampió es reduïa a la meitat la prevalença d'atòpia i de sensibilització a àcars de la pols, comparat amb nens vacunats contra el xarampió, la qual cosa suggereix que en els nens infectats

es va produir una desviació cap a una resposta tipus Th1<sup>171</sup>. Probablement passa el mateix amb altres virus respiratoris, i això podria explicar la relació inversa entre la incidència d'atòpia o asma i el nombre de germans més grans en la família (major exposició a virus)<sup>172</sup>. També s'ha descrit una menor incidència d'al·lèrgia en nivells socioeconòmics baixos, que s'associaria a una major exposició a agents infecciosos<sup>173</sup>. Un altre estudi evidència que quan major és la dimensió de la resposta a la tuberculina menor és l'aparició d'alteracions atòpiques<sup>174</sup>. Aquesta major exposició a microorganismes explicaria la menor prevalença d'asma i atòpia a Alemanya oriental comparat amb l'occidental<sup>175</sup>.

Probablement aquestes infeccions de repetició afavoririen la producció de IL-12, IL-18 e IFN- $\gamma$ , suprimint les respostes Th2 i les circumstàncies que afavoreixen la sensibilització a al·lèrgens<sup>176</sup>. En canvi, el freqüent ús d'antibiòtics, així com la lactància artificial o el consum d'aliments processats, poden alterar la flora intestinal i reduir la capacitat de les mucoses de produir resposta immunològica del tipus Th1<sup>164</sup>.

Cal destacar que no tots els processos infecciosos actuen de la mateixa manera. Un exemple és el virus respiratori sincicial (VRS) que és capaç d'augmentar les respostes Th2 en individus susceptibles<sup>177</sup>. De fet, encara està en debat si les bronquiolitis amb sibilants induïdes per infeccions virals són una entitat nosològica independent i l'asma al·lèrgica una altra, o si es tracta de variants d'un mateix procés.

Altres agents infecciosos, com els rinovirus, s'associen amb el desenvolupament de respostes tipus Th2. Sembla per tant, que els agents infecciosos amb els quals té contacte l'individu poden tenir una influència en l'aparició de malalties al·lèrgiques.

#### **1.3.4.2.3 Contaminació ambiental**

Les al·lèrgies respiratòries estan augmentant en la majoria de països, i afecta principalment els individus que viuen en zones urbanes. Aquest augment està relacionat entre altres factors amb la contaminació de l'aire. Estudis de laboratori confirmen l'evidència epidemiològica que la inhalació d'alguns contaminants, de forma aïllada o en combinació, afecta adversament la funció pulmonar de malalts asmàtics.

Els contaminants ambientals més abundants en àrees urbanes amb alts nivells de trànsit de vehicles de motor són el diòxid de nitrogen, les partícules respirables i l'ozó. Aquestes dues últimes substàncies incrementen la hiperreactivitat bronquial en individus predisposats. Més a més, induint inflamació de les mucoses respiratòries, augmenten la permeabilitat del seu epiteli enfront dels al·lèrgens. Les partícules de combustió dièsel sembla que modulen la resposta immunitària incrementant la producció d'IgE, facilitant la sensibilització al·lèrgica en pacients atòpics i el desenvolupament de símptomes respiratoris<sup>178,179</sup>.

#### **1.3.4.2.4 Tabaquisme**

El tabaquisme actiu està relacionat amb un augment en les concentracions sèriques d'IgE, i amb un risc elevat de sensibilització al·lèrgica i desenvolupament d'asma per alguns al·lèrgens ocupacionals. En alguns adults, considerats individus de risc, com dones amb familiars de primer grau amb asma bronquial, el tabaquisme passiu també elevaria la IgE<sup>180</sup>.

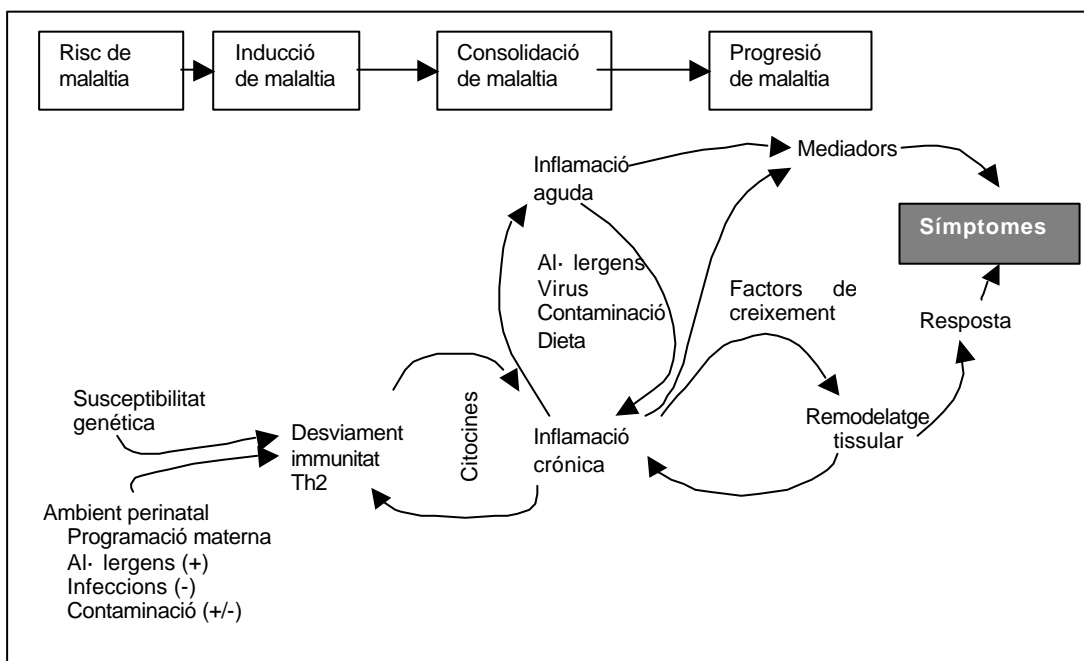
L'efecte del tabaquisme passiu en els nens és més controvertit per la dificultat en valorar i comparar estudis fets amb dissenys molt diferents, per aïllar l'efecte de l'exposició prenatal de la postnatal, etc. Hi ha una relació positiva entre l'exposició al fum del tabac i la presència de malalties respiratòries, inclús l'asma, i otitis



mitjana, especialment quan la fumadora és la mare. En contra d'estudis previs, les darreres meta-anàlisi no evidencien una associació entre sensibilització al·lèrgica i l'hàbit tabàquic dels pares<sup>181</sup>.

### 1.3.5 INFLAMACIÓ EN L'ASMA

Actualment s'accepta que l'asma és una malaltia inflamatòria de les vies aèries en la que l'alliberament de mediadors per part dels mastòcits activats i dels eosinòfils, desenvolupen un paper rellevant. La medicació de mediadors químics com histamina, leucotriens, triptasa i proteïnes bàsiques en secrecions biològiques de pacients amb asma, confirmen la importància d'aquestes cèl·lules. En la Fig. 12 s'esquematitza l'evolució de la malaltia asmàtica des dels factors predisposants fins a la presentació de símptomes<sup>152</sup>.



**Figura 12. Evolució de l'asma**

De Holgate ST<sup>152</sup>.

La sensibilització al·lèrgica i la posterior exposició repetida a l'al·lèrgen indueix una resposta inflamatòria crònica de les vies aèries. L'activació dels mastòcits dependent

de la IgE produeix una ràpida broncoconstricció mediada per l'acció de la histamina, PGD<sub>2</sub>, i els cisteinil leucotriens. A més, aquests mediadors augmenten la permeabilitat microvascular, augmenten la reactivitat del múscul llis de la via respiratòria, i inicien el reclutament de neutròfils i eosinòfils. Els mastòcits també alliberen citocines com IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, GM-CSF i TNF- $\alpha$ , que actuaran en la fase inflamatòria tardana<sup>182</sup>. El reclutament per part de la microvasculatura de la mucosa, de neutròfils, seguits per eosinòfils, cèl·lules T i monòcits, és iniciat per l'efecte de la histamina i dels leucotriens que promouen l'expressió de P-selectina per part de les cèl·lules endotelials, que interactuant amb molècules d'adhesió dels leucòcits, permet el seu rodament. Després, per l'acció de la ICAM-1 i la VCAM-1 endotelials, els leucòcits s'adhereixen i migren a través de la paret endotelial cap als teixits.

La migració, el "priming" i la supervivència perllongada dels eosinòfils depenen de l'acció de la IL-5 i el GM-CSF, mentre que quimiocines com el RANTES, la proteïna quimiotàctica dels monòcits 3, l'eotaxina i la IL-8, són importants per dirigir la migració dels leucòcits<sup>183</sup>. Tenint en compte que aquestes substàncies són secretades no tan sols per mastòcits, sinó també per cèl·lules epitelials, endotelials, múscul llis i fibroblasts, sembla clar que existeix una gran interacció entre els factors iniciadors de la inflamació al·lèrgica, i el seu manteniment.

Per estudis de biòpsies i de rentats bronquials, s'ha evidenciat que el principal objectiu de l'atac de mastòcits i eosinòfils en l'asma és l'epiteli bronquial, que esdevé fràgil i perd les seves propietats protectores<sup>184</sup>. La secreció de factors de creixement per part de les cèl·lules epitelials, múscul llis i fibroblasts, resulta en una resposta regeneradora i remodeladora del teixit, amb deposició de col·lagen tipus III i V, que altera l'estructura de la via aèria i contribueix a la cronicitat de la malaltia<sup>185</sup>. Una altra conseqüència del dany epitelial és l'augment en l'expressió de receptors

virals com l'ICAM-1, el que explicaria la major susceptibilitat d'aquests pacients a les infeccions com el refredat comú.

El remodelatge és un concepte que descriu els processos dinàmics que donen lloc a canvis estructurals en les vies aèries a l'asma bronquial. Aquests canvis estructurals es creu que condueixen a una irreversibilitat de l'obstrucció al flux aeri i possiblement també al desenvolupament d'hiperreactivitat bronquial. Es creu que el remodelatge és conseqüència de mecanismes de lesió i reparació secundaris a la inflamació de la via aèria<sup>186</sup>. Ja fa dècades que es varen descriure els canvis anatomo-patològics associats a l'asma i que consisteixen en infiltració de la paret bronquial amb cèl·lules inflamatòries, engruiximent de la membrana basal i del múscul llis bronquial, i exudació de plasma amb edema de la paret.

L'infiltrat inflamatori està compost majoritàriament per mastòcits, eosinòfils i limfòcits. Els mastòcits presenten un estat d'activació, especialment a la submucosa. Els eosinòfils són presents a l'epiteli i a la submucosa i s'ha descrit un augment de proteïna catiónica de l'eosinòfil (ECP) i proteïna principal bàsica (MBP) en els rentats bronquials de pacients asmàtics, indicant l'activació d'eosinòfils<sup>187, 188</sup>. Tant el nombre de limfòcits com les cèl·lules plasmàtiques estan incrementats en la paret de les vies aèries dels individus asmàtics quan es comparen amb les d'individus sans. A més, els limfòcits es troben activats, segons indica l'expressió de CD25<sup>189</sup>.

La fibrosi subepitelial amb hialinització i engruiximent de la *lamina reticularis*, per la deposició de col·lagen tipus III i V, fibronectina i tenascina, dona lloc a l'aparent engruiximent de la membrana basal, mentre que la *lamina rara* i la *lamina densa* són de dimensions normals<sup>190, 191</sup>. Degut a que l'epiteli és una important font de factors de creixement, citocines, quimiocines i altres mediadors, es creu que pot tenir un paper important en la fibrosi subepitelial<sup>192</sup>. El GM-CSF, per exemple, es

sobreexpressa en l'epiteli bronquial, inclús en pacients amb asma lleu<sup>193</sup>, i s'ha relacionat amb la producció de reaccions de fibrosi en els pulmons. A més, per el seu efecte sobre la supervivència i activació dels eosinòfils, el GM-CSF pot promoure indirectament el remodelatge. També el TGF- $\beta$ , que s'expressa a l'epiteli, eosinòfils, macròfags i fibroblasts, té propietats immunoreguladores com a l'estimulació del creixement dels fibroblastes i l'inhibició del creixement de cèl·lules epitelials<sup>194</sup>. El factor de creixement epidèrmic (EGF) i el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF) tenen una participació en el procés de reparació epitelial. Les endotelines són un altre dels mediadors probablement involucrats en el procés de remodelatge<sup>195</sup>.

### 1.3.6 TRACTAMENT DE L'ASMA BRONQUIAL

Les mesures terapèutiques per tractar l'asma poden agrupar-se en tres àmbits: les mesures preventives per evitar els símptomes, la farmacoteràpia convencional i la immunoteràpia específica

L'objectiu de les mesures preventives és, igual que en qualsevol altre malaltia en la que s'hagi identificat un agent etiopatogènic, evitar el desenvolupament de símptomes. Quan s'ha identificat un al·lèrgen al qual està sensibilitzat el pacient, s'intentarà aplicar mesures higièniques per disminuir l'exposició. També hi ha autors que defensen la prevenció primària en individus amb risc de desenvolupar noves sensibilitzacions (pacients atòpics, individus amb antecedents familiars d'atòpia, etc.). A més l'evicció de desencadenants no específics, com poden ser les infeccions respiratòries, els irritants inhalats, etc. contribueixen a disminuir l'aparició de símptomes.

El tractament farmacològic actual de l'asma pot ser dividit en dos: el tractament amb fàrmacs preventius i el tractament simptomàtic. El tractament de base per evitar

l'aparició de símptomes es duu a terme amb fàrmacs antiinflamatoris com són les cromones inhalades, els corticosteroids inhalats i els anti-leucotriens que s'administren per via oral. L'objectiu és disminuir la inflamació i suprimir la simptomatologia subseqüent. El tractament simptomàtic es basa en els broncodilatadors, com són els agonistes beta-adrenèrgics inhalats i els agents anticolinèrgics inhalats, com el bromur d'ipratropi. Les teofilines orals, d'ús molt estès fa uns anys, han passat a un segon pla, a pesar que hi ha autors que defensen la seva utilització adduint efectes antiinflamatoris a més de broncodilatadors.

La immunoteràpia específica és un tractament que persegueix modificar la resposta immune de l'individu front l'al·lergen, induint la tolerància i la desaparició de la resposta clínica simptomàtica per l'exposició al mateix. La seva utilització es va iniciar a principis del segle XX i si bé la seva eficàcia clínica en el tractament de la rinitis i l'asma bronquial és acceptada, el seu mecanisme d'acció tot just es comença a comprendre. El següent capítol es centra en aquesta modalitat terapèutica.

### 1.3.7 IMMUNOTERÀPIA

#### 1.3.7.1 DEFINICIÓ

El darrer article d'opinió de l'Organització Mundial de la Salut<sup>196</sup> defineix la immunoteràpia (IT) amb extractes al·lèrgics, o vacunes terapèutiques per a les malalties al·lèrgiques, com "l'administració de quantitats gradualment creixents d'un extracte al·lèrgic per millorar la simptomatologia causada per l'exposició posterior a l'al·lèrgen". Actualment la IT s'utilitza per a tractar malalties al·lèrgiques, com la rinoconjuntivitis i l'asma, causades per al·lèrgens inhalats, i és el tractament d'elecció per a les reaccions al·lèrgiques sistèmiques produïdes per la picada d'himenòpters (abelles i vespes).

#### 1.3.7.2 HISTÒRIA

Al 1911 Noon i Freeman varen iniciar una forma empírica de tractament per protegir als seus pacients dels efectes de la "toxina del pol·len"<sup>198</sup>. Basant-se en el concepte de les vacunes clàssiques, suposaven que l'administració de mínimes dosis del mateix pol·len induiria la protecció mitjançant una "antitoxina". Era l'inici de la immunoteràpia. Praustnitz i Kustner, en 1921, van demostrar l'existència d'un factor serològic que podia transferir-se a pacients no al·lèrgics, i que era un mediador d'hipersensibilitat cutània (prova P-K o de transferència passiva)<sup>12</sup>. Al 1935, Cooke i col·laboradors varen postular que existien dos tipus d'anticossos contra el pol·len, i que la IT augmentava els anticossos "bloquejants"<sup>197</sup>. Varen transcórrer 30 anys abans que Ishizaka i el seu grup identifiquessin l'agent "reagínic", la IgE<sup>13,14</sup>.

El tractament amb extractes al·lèrgics es va denominar inicialment desensibilització. Posteriorment, degut a que la resposta clínica no sempre era absoluta, es va substituir per el mot hiposensibilització. El terme immunoteràpia es

va introduir pel fet que el seu mecanisme d'acció es produeix a través del sistema immunològic. Com s'ha mencionat prèviament, l'OMS ha utilitzat el terme vacunes per a les malalties al·lèrgiques per designar aquest procediment.

### 1.3.7.3 EXTRACTES AL·LERGÈNICS

Els extractes al·lèrgics són preparats obtinguts a partir dels components actius de substàncies animals o vegetals. S'elaboren a partir dels extractes crus mitjançant la seva purificació. Aquests extractes s'utilitzen per a la realització de proves cutànies i per elaborar les vacunes per al tractament de les malalties al·lèrgiques. Un extracte **al·lèrgic estandarditzat** és un extracte procedent d'una font de material adequada amb una composició antigènica coneguda, i amb una potència al·lèrgica total coneguda i constant.

El primer intent d'estandardització dels extractes al·lèrgics va ser realitzat a principis del segle XX, quan Noon al començar a aplicar tractaments de "desensibilització", va definir una unitat de mesura del contingut dels extractes. La **Unitat Noon** va ser definida com la que expressa l'activitat d'un micrògram de pol·len de *Phleum* sec. És a dir, una solució titulada 1000 Unitats Noon/ml té la mateixa activitat que una dilució d'extracte 1/1000<sup>198</sup>. Posteriorment, Cooke va observar que la al·lèrgicitat d'un extracte estava contingut en la fracció proteica, i va definir la potència d'un extracte basant-se en el seu contingut proteic. Així una **Unitat de Nitrogen Proteic (PNU)** representava 0,00001 mg de nitrògen proteic, la quantitat de nitrogen proteic corresponent a 62 ng de proteïna<sup>199</sup>. Amb aquesta definició no es tenia en compte que els extractes al·lèrgics poden contenir una quantitat considerable de proteïnes no al·lèrgiques, i per tant no es mesurava la seva activitat biològica real. Posteriorment es van definir les **Unitats Biològiques** de potència (BU), basant-se en corbes de dosi resposta amb proves cutànies comparades amb l'activitat de la histamina. La primera unitat d'aquest tipus va ser

proposada per Aas i adoptada pel comitè escandinau d'estandardització (Scandinavian Standardization committee)<sup>200</sup>. Es va definir de la següent forma: "Un extracte biològic que proporciona (en els individus sensibles) una resposta igual a la de la histamina a la concentració d'1 mg/ml en la prova de prick, conté una potència de 1000 UB".

Les unitats **Histamine Equivalent in Prick Testing** (HEP), també es basen en la comparació de la reacció de l'extracte amb el produït per la histamina. Es defineix així: "Un extracte al·lèrgic té 10 HEP quan provoca a la pell una reacció específica consistent en una pàpula del mateix tamany mitjà que una referència positiva d'histamina de 54'3 mmol/l (Histamina HCl a una concentració de 10 mg/ml) quan ambdues solucions són utilitzades amb la mateixa tècnica (prick test) en un mínim de 20 individus que són clínicament al·lèrgics i amb reactivitat cutània front a l'al·lèrgic en qüestió"<sup>201</sup>. Equival a 10.000 UB segons el comitè escandinau d'estandardització.

Una altra Unitat Biològica va ser definida per Brighton a Gran Bretanya i corresponia a la següent: "Un extracte en el que s'ha comprovat prèviament la inexistència d'irritants conté 10 Unitats d'activitat/ml quan en el prick efectuat en 30 individus clínicament sensibles dóna lloc a una pàpula mitjana (mitjana geomètrica) de 75 mm<sup>2</sup>"<sup>202</sup>.

Altres temptatives han intentat definir els extractes pel seu contingut en al·lèrgens principals, com pot ser la quantificació dels al·lèrgens en **Unitats de Massa** (UM) en µg/ml. Aquests extractes venen mesurats en BU/ml, i a més s'han quantificat cadascun dels al·lèrgens principals en UM. També contenen els altres al·lèrgens (intermedis i menors) de forma demostrada encara que no estiguin quantificats en UM. Les fases de desenvolupament d'aquest tipus d'extractes són les següents<sup>203</sup>:



1. Identificació de l'al·lergen en aquella espècie i demostració de que es tracta d'un al·lergen clínicament rellevant (sensibilitza com a mínim al 50% dels pacients)
2. Purificació de l'al·lergen mitjançant tècniques convencionals de purificació de proteïnes i establiment de la seva homogeneïtat per criteris de puresa també convencionals.
3. Confirmació que l'al·lergen purificat produeix reacció cutània, com a mínim en el 50% dels pacients al·lèrgics a l'extracte complet i que aproximadament el mateix percentatge té IgE específica per aquell al·lergen.
4. Obtenció d'anticossos monoclonals en ratolins, que reconeixin a l'al·lergen i que presentin una especificitat i afinitat adequades.
5. Posada a punt de l'immunoassaig que permeti valorar de forma quantitativa l'al·lergen purificat i, per comparació amb aquest al·lergen purificat, permeti valorar l'al·lergen en una barreja complexa on hi hagi altres proteïnes al·lèrgiques i no al·lèrgiques.
6. Determinació de les concentracions relatives dels al·lèrgens en les espècies amb més d'un al·lergen principal i determinació de la relació entre la quantitat de proteïna al·lèrgica i la seva activitat, tant referit a si mateix com a altres al·lèrgens.
7. Assignació de la quantitat de  $\mu\text{g}$  de cada al·lergen principal que conté un extracte amb una potència biològica determinada. La composició quantitativa proporcional dels al·lèrgens principals ha de ser un reflex del material original que sensibilitza als pacients.

Una altra tècnica que pot ser empleada per la estandardització del extractes

al· lergènic és el Radio Allergosorbent Test (RAST) inhibició. Aquest mètode està basat en la capacitat d'un extracte per inhibir la activitat RAST d'un sèrum amb alt contingut en anticossos IgE específics contra ell. L'al· lergen és diluït seriadament i cadascuna de les dilucions s'incuba amb el sèrum específic i un disc de cel· lulosa activat amb bromur de cianògen que conté l'al· lergen fixat covalentment. S'estableix així una reacció de competitivitat entre l'al· lergen en fase líquida i l'unit al disc pels anticossos IgE específics. Per tant, quant major sigui la quantitat d'al· lergen en suspensió, menor quantitat d'IgE s'unirà al disc. La IgE fixada al disc és detectada mitjançant anti-IgE marcada isotòpicament. En una gràfica semilogarítmica s'obté una recta que permet calcular la dilució capaç d'inhibir el 50%, i se li poden atribuir unes unitats arbitràries.

Per obviar els problemes que produeixen els extractes al· lergènic actuals, com poden ser les reaccions adverses que poden produir-se en el curs de la IT, s'han desenvolupat noves formes de manufacturació d'extractes. Actualment és possible preparar extractes d'al· lergens mitjançant tècniques de biologia molecular; són els **al· lergens recombinants**. Els al· lergens principals i menors poden ser clonats, seqüenciats, expressats i provats per determinar la seva potència biològica.

#### *1.3.7.4 TIPUS DE VACUNES AL· LERGÈNIQUES*

Actualment s'utilitzen en la preparació de les vacunes al· lergèniques diversos tipus d'extractes, segons les modificacions que es realitzin al producte al· lergènic original durant la seva manufacturació. A continuació es descriuen els més freqüentment usats.

##### **1.3.7.4.1 Vacunes aquoses**

Són extractes no modificats, obtinguts a partir del material al· lergènic desengreixat (habitualment amb èter) i diluït en sèrum salí. Per conservar -los s'hi afegeix fenol,

glicerina o bé es liofilitzen. Alguns es dilueixen en seroalbúmina. Si bé molts d'ells encara venen quantificats en unitats de pes/volum (quantitat de matèria prima en pes en una quantitat fixa de líquid), d'altres estan perfectament estandarditzats. El seu ús més freqüent és en els tractaments per al·lèrgia al verí d'himenòpters. També s'han utilitzat en pautes ràpides o agrupades d'inici d'IT, ja que al absorbir-se teòricament de forma ràpida, els possibles efectes adversos apareixerien immediatament i permetria tractar-los de forma adequada en el context hospitalari.

#### **1.3.7.4.2 Vacunes depot i modificades**

Un problema dels extractes aquosos és l'alt percentatge d'efectes secundaris que apareixen amb la seva administració. Per obviar aquests inconvenients, s'han desenvolupat vacunes depot i modificades per intentar disminuir els efectes adversos i millorar la seva eficàcia augmentant la seva capacitat de modular el sistema immune.

La *modificació física* inclou l'adsorció i inclusió d'al·lèrgens com vacunes depot, utilitzant-se substàncies com l'alumini, fosfat càlcic, tirosina o liposomes.

La *modificació química* es refereix als denominats "al·lèrgoides", modificats amb formaldehid, glutaraldehid o alginat, que han demostrat en diversos estudis mantenir la seva eficàcia i disminuir la seva al·lèrgenicitat.

Existeixen vacunes que combinen modificacions químiques i físiques.

#### **1.3.7.5 VIES D'ADMINISTRACIÓ DE LA IMMUNOTERÀPIA**

Des dels seus inicis, la via d'administració de la IT ha estat la subcutània, i és per tant amb la que s'han efectuat la majoria d'estudis per tal de valorar la seva eficàcia i seguretat. Però la inconveniència de les freqüents visites a centres sanitaris per a la seva administració, així com el malestar produït per la injecció, han motivat la

recerca de noves rutes d'administració, que s'enumeren a continuació:

- Oral: la vacuna (en gotes, càpsules o comprimits) s'empassa immediatament.
- Sublingual ingerida: la vacuna es manté 1 o 2 minuts sota la llengua i després s'ingereix.
- Sublingual escopida: la vacuna es manté 1 o 2 minuts sota la llengua i després és escopida.
- Nasal: la vacuna (aquosa o en pols) es alliberada al nas amb dispositius adequats.
- Bronquial: la vacuna (aquosa o en pols) es alliberada al arbre bronquial amb dispositius adequats.

Encara que s'han publicat diversos estudis, no hi ha encara evidència suficient sobre eficàcia i seguretat de les vacunes administrades per aquestes rutes alternatives.

#### *1.3.7.6 PAUTES D'ADMINISTRACIÓ*

En el cas de la IT subcutània, bàsicament hi ha dues modalitats d'administració, una perenne i una altra pre-estacional. En la forma perenne, la pauta habitual consisteix en la injecció subcutània setmanal de dosis creixents de l'extracte fins arribar a la que es considera la dosi de manteniment. Un cop assolida, en 12 a 15 setmanes, es passa de forma progressiva a l'administració un cop cada 4 setmanes. Els consensos recomanen mantenir aquestes vacunes entre 3 i 5 anys.

A vegades interessa arribar a una dosi de manteniment de forma ràpida degut a la proximitat de l'estació pol·línica, a que el pacient necessita una desensibilització ràpida, etc. Per aquests casos s'han dissenyat unes pautes accelerades per

escurçar el període d'iniciació fins arribar a la dosi òptima i disminuir el nombre de visites per part del pacient al centre mèdic.

Cap a finals dels anys 80 és varen introduir les anomenades *pautes ràpides* ("rush") que s'han d'aplicar en un context hospitalari. Segueixen una dosificació similar a les pautes convencionals, però aplicant les dosis amb intervals de 30 minuts, arribant-se a la dosi de manteniment en un període d'un a tres dies. S'efectuen habitualment amb extractes aquosos. Tenen l'inconvenient d'induir nombroses reaccions adverses, per la qual cosa s'utilitzen només per a tractaments amb extractes amb verí d'himenòpters, normalment en casos molt seleccionats<sup>204</sup>.

Les *pautes "cluster" o de dosis agrupades* consisteixen en agrupar l'administració de varies dosis en un mateix dia, i després d'un interval d'uns dies (habitualment una setmana), es torna a fer una nova administració de múltiples dosis. Així, i depenent del disseny de la pauta, es pot arribar a la dosi de manteniment en unes 3 setmanes<sup>205</sup>.

També existeixen pautes pre-estacionals, que s'apliquen en pacients amb al·lèrgia pol·línica i clínica estacional. S'apliquen les dosis progressives en les setmanes prèvies a la pol·linització de la planta responsable de la malaltia i quan s'arriba a la dosi màxima és suspèn el tractament fins l'any següent.

#### 1.3.7.7 CANVIS IMMUNOLÒGICS INDUÏ TS PER LA IMMUNOTERÀPIA

Encara que l'eficàcia clínica de la immunoteràpia (IT) específica ha estat demostrada en diversos estudis, com la meta-anàlisi d'Abramsón<sup>206</sup> i la revisió del grup Cochrane<sup>207</sup>, els mecanismes d'actuació subjacents no es coneixen totalment. És difícil valorar els resultats dels diversos estudis degut a la diferent metodologia usada en el disseny i avaluació dels resultats clínics i biològics. Els al·lèrgens utilitzats en els estudis són molt variats (àcars, pol·len, verí d'himenòpters, etc.), així

com les pautes (convencional, ràpida, pre-estacional, etc.) i les vies d'administració (subcutània, sublingual, etc.). Els resultats clínics s'avaluen mitjançant valoracions de símptomes, medicacions i proves "in vivo" amb sistemes de puntuació diferents. Els canvis biològics són mesurats en diferents fluids o teixits (sang perifèrica, secrecions nasals, rentats broncoalveolars, etc.), i s'hi mesuren cèl·lules i mediadors molt variats, i molts cops de forma parcial en cada estudi. Per tant, sintetitzar tots aquests resultats i comparar-los entre ells és extremadament difícil.

Els canvis immunològics que s'han descrit en el curs de la IT han estat paral·lels als avenços en les coneixements immunològics de la reacció al·lèrgica que s'han succeït en aquests darrers anys.

No es coneix exactament com la IT induïx aquests canvis immunològics, però s'apunten diversos factors:

- l'administració de quantitats més elevades de l'antigen que les habitualment trobades en l'exposició ambiental als al·lèrgens pot induir un canvi en l'activació de les cèl·lules T
- la diferent via d'administració, com la injecció subcutània, pot induir la participació de cèl·lules presentadores d'antigen diferents, que afavoririen la tolerància en lloc de la sensibilització i/o la reacció al·lèrgica
- la pauta d'administració en forma de dosis aïllades, elevades i repetides, en lloc d'una exposició més o menys continuada durant un període, també podria modificar la resposta immunològica.

#### **1.3.7.7.1 Efectes antiinflamatoris**

S'ha objectivat mitjançant diversos estudis que la IT produeix una disminució de la

reactivitat de l'individu front l'al·lergen, sent necessari incrementar la dosi necessària per induir la mateixa resposta. Alguns d'aquests estudis també demostren que la hiperreactivitat bronquial, nasal i conjuntival enfront a estímuls inespecífics, disminueixen després del tractament amb IT<sup>208,209,210</sup>.

També s'ha descrit en el curs de la IT una disminució en l'òrgan diana i fluids de la presència de cèl·lules i mediadors implicats en les reaccions inflamatòries al·lèrgiques. En la Taula 6 s'enumeren alguns dels treballs que descriuen aquests canvis.

**Taula 6. Canvis en cèl·lules i mediadors descrits amb la immunoteràpia**

<b>Autor</b>	<b>Extracte</b>	<b>Efecte</b>
<b>Creticos et al<sup>211</sup></b>	Ambrosia	Inhibició de la resposta nasal post-provocació i disminució de mediadors (histamina, N-alfa-tosil-L-arginina-esterasa, prostaglandina D <sub>2</sub> )
<b>Otsuka et al<sup>212</sup></b>	<i>D pteronyssinus</i>	Disminució de mastòcits en mucosa nasal
<b>Nish et al<sup>213</sup> Varney et al<sup>214</sup></b>	Gramínies	Inhibició de la resposta cutània i disminució del nombre d'eosinòfils a la biòpsia
<b>Furin et al<sup>215</sup></b>	Ambrosia	Disminució d'eosinòfils en fluid nasal post-provocació
<b>Durham et al<sup>216</sup></b>	Gramínies	Inhibició de resposta nasal tardana i eosinòfils activats post-provocació
<b>Rack et al<sup>208</sup></b>	Bedoll	Disminució d'eosinòfils i proteïna catiónica de l'eosinòfil (ECP) al rentat broncoalveolar (BAL) post-provocació
<b>Kohno et al<sup>217</sup></b>	<i>D farinae</i>	Disminució d'eosinòfils i ECP en esput post-provocació

#### 1.3.7.7.2 Mecanismes humorals

Un dels canvis descrits inicialment i que es van relacionar amb el mecanisme d'acció de la IT es l'augment que s'observa d'anticossos IgG específics per l'antigen. La major part dels estudis mostren que inicialment s'eleva els nivells

d'IgG1 però després tendeixen a disminuir, mentre que els de la subclasse IgG4 augmenten progressivament i es mantenen elevats durant el tractament<sup>218</sup>. Es va suggerir que la IgG específica podia bloquejar la resposta a la IgE, competint en la seva unió a l'antigen, i existeixen estudis tant "in vitro"<sup>219</sup> com "in vivo"<sup>220</sup> que recolzen aquesta hipòtesi. Malgrat això, hi ha poca correlació entre els nivells de IgG i paràmetres clínics en pacients al·lèrgics tractats o no tractats amb IT<sup>221</sup>, i de fet, elevacions d'IgG4 també s'han associat a fracassos de la IT<sup>222</sup>. També s'ha postulat que la IgG (especialment la IgG4), podria participar en l'entrecreuament entre els receptors FcεRI i FcγRIIb (receptor de baixa afinitat IIb per a la IgG) dels mastòcits, i inhibir així el senyal del FcεRI que provoca l'alliberament de mediadors<sup>223</sup>. Alguns estudis efectuats amb IT amb pol·len de gramínies, han trobat una correlació entre l'índex IgG4/IgG1 i els nivells d'IgE<sup>224</sup> o amb la millora simptomàtica després de la IT<sup>225</sup>. En el cas d'himenòpters, s'ha considerat la IgG4 com a protectora en apicultors que són picats amb freqüència, però que no presenten reaccions al·lèrgiques<sup>226</sup>. Alguns autors associen els augments d'IgG4 amb estímuls antigènics crònics. Tanmateix és possible que aquests canvis en la concentració d'IgG siguin un epifenomen de la IT.

La IT induïx un augment transitori dels nivells de IgE total i IgE específica, seguit per una disminució progressiva durant els mesos o anys següents<sup>227,228</sup>. A més, en pacients al·lèrgics a pol·len, la IT inhibeix l'elevació dels nivells de IgE durant l'estació pol·línica. De totes maneres, en aquests estudis no es comprova una bona correlació amb la resposta clínica a la IT<sup>229</sup>.

#### **1.3.7.7.3 Anèrgia de les cèl·lules T**

Fa unes dècades ja es va descriure que la IT dóna lloc a una disminució de la resposta limfoproliferativa antígen-específica<sup>230</sup>. En treballs realitzats amb IT a verí de himenòpters, aquesta inhibició apareixia de forma molt precoç en el



tractament, encara que no s'acompanyava inicialment d'una tolerància per part de les cèl. B. Els treballs d'Akdis *et al* realitzats "in vitro" amb verí d'himenòpters demostren que aquesta disminució de la resposta proliferativa no sembla ser deguda a una delecció de les cèl. T antigen-específiques, ja que pot recuperar-se mitjançant l'addició de IL-2 o IL-15 als assajos<sup>231</sup>. En un treball posterior, els mateixos autors atribueixen l'inducció d'un estat d'anèrgia a l'acció de la IL-10, produïda per cèl. lules T perifèriques específiques després de l'administració d'altres dosis d'al·lèrgen durant la IT<sup>82</sup>.

També s'ha demostrat una disminució de les respostes proliferatives de les cèl. lules T en casos d'al·lèrgia a pneumoal·lèrgens. En un interessant estudi, Lack *et al* comproven que aquest descens en la proliferació, és específic per l'antigen amb el qual s'ha realitzat la IT<sup>232</sup>. Aquests autors demostraven que en pacients sensibilitzats a *D pteronyssinus* (Dpt) i a epíteli de gat, la IT amb extracte de Dpt induïa una disminució selectiva de la proliferació de cèl. lules T front a Dpt però la mantenien si s'estimulaven amb epíteli de gat.

#### **1.3.7.7.4 Canvis en la producció de citocines**

Els coneixements actuals sobre la immunopatogènesi de les reaccions al·lèrgiques han possibilitat el plantejament d'hipòtesis sobre els mecanismes d'actuació de la IT. Les cèl. lules Th2 tenen un paper crucial en la fisiopatologia de la inflamació al·lèrgica, induint la producció d'IgE al·lèrgen-específica i promovent la infiltració eosinofílica en teixits diana. És per tant natural plantejar que la IT podria actuar modulant la resposta de les cèl. lules T front l'al·lèrgen.

Existeixen nombrosos treballs que indiquen que una possible forma d'acció de la IT és a través d'un canvi a nivell dels patrons de resposta de les cèl. lules T al·lèrgen específiques<sup>233</sup>. El desenvolupament de rinitis o d'asma al·lèrgica, s'associa amb

una producció de IgE específica per a l'al·lergen, que es troba sota el control de la IL-4 (i la IL-13) produïda per limfòcits T<sup>234,52</sup>. L'eosinofília que es troba en aquests pacients depèn en part de la producció de IL-5 per part de les mateixes subpoblacions limfocitàries<sup>235,236</sup>. Seria lògic especular que la IT podria conduir a una alteració en la resposta de les cèl·lules T enfront l'al·lergen modificant o reduint les citocines que produeixen. Aquesta desviació en les cèl·lules T hauria de relacionar-se amb la producció d'IgG i IgE específica, i amb la inhibició del reclutament d'eosinòfils mediat per citocines, així com amb la reducció de la seva activació i persistència en els teixits durant la resposta tardana. Una disminució en la producció de citocines tipus 2 o un augment en la producció de IFN- $\gamma$  i altres citocines tipus Th1 explicarien aquests efectes<sup>237,238</sup>.

Malgrat que tant l'anafilaxi per picada d'himenòpters com les malalties al·lèrgiques respiratòries s'associen a una expressió inapropiada de citocines tipus Th2, es tracta de dues entitats clínicament disperses, i per tant pot ser que la IT actuï de forma diferent en cadascuna d'elles. Malgrat això, s'exposen en conjunt els resultats de diversos estudis sobre la producció de citocines abans i després de la IT (Taula 7). S'observa, avaluat en conjunt, que hi ha una tendència cap a l'augment en la producció o expressió de citocines tipus Th1 (IFN- $\gamma$ ) en detriment de les tipus Th2 (IL-4, IL-5), encara que els resultats no són totalment concordants en els diferents treballs, possiblement degut al diferent mètode d'estudi (diferents tipus cel·lulars, estimulació antígen-específica o inespecífica, diverses tècniques per determinar la producció de citocines, etc.).

**Taula 7. Canvis en la producció de citocines relacionat amb el tractament amb la immunoteràpia**

Autor	Extracte	Cèl· lules	IL-4	IFN- $\gamma$	IL-5	IL-4/IFN
Akdis <i>et al</i> <sup>231</sup>	Abella	CMSP	↓	↓		
Akoum <i>et al</i> <sup>239</sup>	Abella	CMSP	↓	↑		
Bellinghausen <i>et al</i> <sup>240</sup>	Abella o vespa	CMSP	↓	↑		
Benjaponpitak <i>et al</i> <sup>241</sup>	Gramínies o àcars	CMSP	↓			↓
Durham <i>et al</i> <sup>216</sup>	Gramínies	Mucosa nasal	=	↑	=	
Ebner <i>et al</i> <sup>242</sup>	Gramínies	Clones cèl.T	↓	=		↓
Hamid <i>et al</i> <sup>243</sup>	Gramínies	RCT	↓	↑		
Holter <i>et al</i> <sup>244</sup>			↓			
Jutel <i>et al</i> <sup>245</sup>	Abella	CMSP	↓	↑	↓	
Kämmerer <i>et al</i> <sup>246</sup>	Abella	CMSP	↓			
Lack <i>et al</i> <sup>232</sup>	Àcars	CMSP	=	↑		
Lu <i>et al</i> <sup>247</sup>	Àcars	CMSP	↓			
Mac Donald <i>et al</i> <sup>248</sup>	Ambrosia	CMSP	=	↓		
Majori <i>et al</i> <sup>249</sup>	Àcars	CMSP	↓	↑		↓
McHugh <i>et al</i> <sup>250</sup>	Abella	CMSP	↓	↑		
Meissner <i>et al</i> <sup>251</sup>	Gat	CMSP		=	↓	
O'Brien <i>et al</i> <sup>252</sup>	Àcars	CMSP	↓	↓		
Pène <i>et al</i> <sup>253</sup>	Gat	CMSP	↓	=		
Secrist <i>et al</i> <sup>233</sup>	Gramínies o àcars	CMSP	↓	=		
Segura <i>et al</i> <sup>254</sup>	Abella	CMSP	↓	↓		
Söderlund <i>et al</i> <sup>255</sup>	Bedoll	CMSP	↓	=	=	
Till <i>et al</i> <sup>256</sup>	Gramínies	CMSP			=	
Van Bever <i>et al</i> <sup>257</sup>	Àcars	CMSP	↓	=	↓	
Varney <i>et al</i> <sup>214</sup>	Gramínies	RCT	=	↑	=	

CMSP: cèl· lules mononuclears de sang perifèrica. RCT: biòpsia de resposta cutània tardana post-injecció intradèrmica d'al· lergen.

Ja al 1980, Rocklin *et al* varen descriure la generació de cèl· lules T supressores durant el tractament amb IT<sup>258</sup>. Com que els limfòcits Th1 es poden considerar com cèl· lules supressores de les activitats Th2, aquest concepte pot ser considerat com la primera descripció correcta del mecanisme d'acció de la IT. Al 1993 van

aparèixer els primers treballs sobre la influència de la IT en la producció de citocines. Secrist *et al* varen descriure una disminució en la producció d'IL-4 per cèl·lules CD4+ de sang perifèrica després de la IT<sup>233</sup>, mentre que Varney *et al*, en biòpsies de respostes cutànies tardanes a proves de provocació amb al·lèrgen, objectivaven un augment del RNA missatger per a IFN- $\gamma$  però no varen trobar modificacions en la IL-4 o IL-5<sup>214</sup>.

Amb IT a verí d'abella, els grups de McHugh<sup>250</sup> i de Jutel<sup>245</sup>, van descriure simultàniament una disminució d'IL-4 i un increment d'IFN- $\gamma$ , en cultius cel·lulars estimulats amb antigen. Les mateixes modificacions, després de la IT amb pol·len de gramínies, va ser descrita per Ebner en clones cel·lulars al·lèrgen-específiques<sup>242</sup>.

Malgrat que en la majoria de treballs hi ha concordància en quant a la disminució de la producció d'IL-4 relacionada amb la IT, els resultats en quant a la secreció de citocines Th1 com l'IFN- $\gamma$  són més variables. Així s'han descrit nivells d'IFN- $\gamma$  augmentats, reduïts o sense modificar després de la IT. Quan no s'observa un augment d'IFN- $\gamma$ , es pot especular que la disminució d'IL-4, decantaria la "balança" cap a una situació Th1. Però també s'ha publicat algun treball com el de MacDonald<sup>248</sup>, que descriu una disminució d'IFN- $\gamma$  sense modificació de la IL-4.

Una de les citocines immunomoduladores més importants relacionades amb respostes immunitàries Th1 és la IL-12<sup>259</sup>. S'ha comprovat que és capaç d'inhibir la inflamació al·lèrgica en models d'animals sensibilitzats<sup>260</sup>. Hamid *et al* van demostrar un increment de macròfags IL-12+ en biòpsies cutànies postprovocació local amb al·lèrgen en pacients tractats amb IT comparats amb pacients no tractats. A més, es correlacionava amb la presència de cèl·lules IFN- $\gamma$ +. S'especulava que les cèl·lules Th1 es generen per la influència de la IL-12, encara

que no es pot descartar que sigui a la inversa, i que l'IFN- $\gamma$  indueixi la producció d'IL-12<sup>243</sup>.

Les respostes inflamatòries del tipus Th1 s'associen a reaccions d'immunitat cel·lular i d'hipersensibilitat retardada. S'ha observat que estan associades a malalties de tipus autoimmunes com l'esclerosi múltiple o la diabetis mellitus tipus I, i a reaccions inflamatòries de defensa antivírica i antibacteriana per patògens intracel·lulars. A pesar d'afavorir l'activació de cèl·lules Th1 en lloc de les Th2, clínicament la IT no s'acompanya d'un augment de les respostes immunes cel·lulars, i no s'ha descrit un augment de l'incidència d'aquestes malalties. Per això, es creu que deu existir un mecanisme que limiti la inflamació cel·lular. Com que la citocina immunosupressora IL-10 sembla tenir un paper important en la inhibició de respostes immunes patològiques, pot ser una candidata per intervenir en aquesta modulació<sup>261, 81</sup>. Molts dels treballs publicats que estudien l'efecte de la IT sobre l'expressió d'IL-10 han estat realitzats amb verí d'himenòpters, i descriuen un augment de la producció d'IL-10 a l'inici del tractament que es relaciona amb la inhibició de la resposta proliferativa<sup>240</sup>. També s'ha descrit amb IT a pneumoal·lèrgens<sup>262, 263</sup>.

La modificació inicial que, per l'acció de la IT, indueix el canvi de la resposta immunitària tipus Th2 (mediada per IgE i que s'expressa clínicament en forma d'al·lèrgia), podria produir-se a nivell de les CPA en el moment de presentació de l'antigen a la cèl·lula T. La presentació antigènica per part d'un tipus diferent de CPA o la modulació de l'expressió de determinades molècules de superfície coestimuladores podrien suposar un punt crític en l'acció de la IT. Així modificacions induïdes per la IT en l'expressió de CD23, CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2) en la CPA podrien afavorir la generació d'un tipus de resposta immune diferent a l'original.

La IT pot acutar simultàniament a més d'un nivell en el sistema immunitari,

modificant senyals generades per les CPA, substàncies produïdes per les cèl·lules T, com citocines, i també altres mediadors secretats per cèl·lules efectores com mastòcits o eosinòfils. El conjunt d'aquestes modificacions són les que indueixen el canvi a nivell clínic de la malaltia al·lèrgica.