

2 JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS DE L'ESTUDI

2.1 JUSTIFICACIÓ

Molts han estat els avenços en el camp de la immunologia que s'han assolit en les últimes dècades i que han ampliat notablement el coneixement sobre la fisiopatologia de les malalties al·lèrgiques. Des de la identificació de la IgE fins a les cèl·lules, mediadors, citocines, quimiocines i receptors, totes les noves troballes han anat afegint peces al trencaclosques.

Malgrat que la immunoteràpia ha estat usada durant quasi un segle, amb l'evidència clínica que és eficaç per millorar els símptomes i disminuir l'ús de medicació en les malalties al·lèrgiques, els mecanismes pels quals exerceix aquest efecte encara no són ben coneguts. S'han formulat múltiples hipòtesis que proposen com a forma d'actuació modificacions en la immunitat humoral i cel·lular, però encara no existeix una evidència inequívoca que correlacioni aquests canvis biològics amb l'eficàcia clínica de la IT. Recentment s'ha fet especial atenció a la possibilitat que la IT indueixi una desviació immune que redrexi el desequilibri existent de producció predominant de citocines tipus Th2 mitjançant un canvi de cèl·lules Th2 cap a Th1, bé sigui per un augment de les cèl·lules Th1 o per una inhibició de les funcions de les cèl·lules T específiques mitjançant la inducció de tolerància o anèrgia.

La majoria de treballs que s'han publicat estudiaven de forma parcial l'efecte de la IT en un o pocs paràmetres, i pocs comparen aquests canvis immunològics amb l'eficàcia clínica. A més, molts experiments es basen en l'activació inespecífica de les cèl·lules i no en la seva resposta específica per l'al·lèrgen. Un altre inconvenient a l'hora d'estudiar el seu efecte és la curta durada del tractament amb IT en molts d'aquests treballs.

La hipòtesi de treball que es planteja en aquest projecte és que els canvis clínics observats en els curs de la IT serien deguts a modificacions de la resposta immunològica induïda per aquest tractament. Aquestes modificacions immunològiques radicarien en un canvi en la resposta de les cèl·lules T consistent en un predomini d'una resposta tipus 1 o una anèrgia de les cèl·lules Th2 específiques per a l'antigen. Això s'objectivaria amb una major producció d'IFN- γ i/o una disminució de producció de IL-4, i per tant, s'han fet determinacions d'aquestes dues citocines durant l'estudi. És possible que els probables canvis siguin conseqüència de modificacions en la presentació de l'antigen i de la producció d'altres citocines per part de les cèl·lules T activades. Per averiguar quins condicionants indueixen aquestes modificacions, s'ha estudiat l'expressió d'IL-10 pels limfòcits T, ja que com s'ha apuntat anteriorment s'ha atribuït a aquesta citocina una funció reguladora. També s'ha considerat interessant estudiar molècules de superfície de les CPA, com el CD86 i el CD23, ja que la modificació de la seva expressió pot també condicionar en part la derivació cap a un tipus o altre de resposta.

Els paràmetres biològics determinats s'han relacionat amb la resposta clínica dels malalts, mesurant els símptomes clínics, l'ús de medicació, les proves de funció respiratòria i proves d'exposició a l'al·lergen.

2.2 OBJECTIUS PRINCIPALS

- Examinar entre individus no atòpics i pacients al·lèrgics a *D pteronyssinus* les diferències en quant a l'expressió d'IL-4, IFN- γ i IL-10 en limfòcits T de sang perifèrica, i de CD23 i CD86 en limfòcits B i monòcits.
- Avaluat si la IT induïx canvis immunològics i milloria clínica en un grup de pacients al·lèrgics.
- Analitzar si l'eficàcia clínica es correlaciona amb els canvis immunològics.

2.3 OBJECTIUS INTERMEDIS

- Establir uns paràmetres de millorança des d'un punt de vista clínic, espiromètric i farmacològic.
- Estandarditzar la tècnica per a determinar citocines intracel·lulars mitjançant citometria de flux en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica.
- Analitzar diversos paràmetres immunològics (IgE total i específica, cèl·lules que expressen citocines intracel·lulars tal com la IL-4, IFN- γ i IL-10, proliferació limfocitària front l'antigen, molècules coestimuladores de les CPA com el CD23 o CD86), i valorar els possibles canvis al llarg del tractament amb IT.

3 PACIENTS, MATERIAL I MÈTODE

3.1 PACIENTS

L'estudi es va iniciar al setembre de 1997. Es van incloure en l'estudi 30 pacients visitats a la Consulta Externa de la Secció d'Al·lèrgia, Servei de Medicina Interna de l'Hospital General de la Vall d'Hebron. Es va obtenir el seu consentiment després d'informar-los sobre el procediment de l'estudi. El projecte fou aprovat pel Comitè d'Ètica dels Hospitals Vall d'Hebron.

3.1.1 CRITERIS D'INCLUSIÓ

- Edat compresa entre els 14 i 30 anys.
- Estar diagnosticats d'asma bronquial lleu persistent o moderada persistent segons la classificació de gravetat del GINA²⁶⁴, amb rinoconjuntivitis simultània o no. L'asma es diagnosticà per la presència de símptomes clínics suggestius (dispnea, tos i sibilants) reversibles espontàniament o per l'ús de broncodilatadors, i la rinoconjuntivitis per la presència de obstrucció nasal, rinorrea, esternuts, picor nasal i ocular, injecció conjuntival i llagimeig.
- Presentar monosensibilització a *Dermatophagoides* demostrada mitjançant proves cutànies i IgE específica (CAP-system) superior a 0.7 kU/L.

3.1.2 CRITERIS D'EXCLUSIÓ

- Presentar sensibilització a altres al·lèrgens.
- Haver seguit tractament amb corticoides sistèmics en els tres mesos previs, així com durant l'estudi.

- Ser portadors de patologia infecciosa de possible transmissió parenteral (VIH, VHB,...), o patir malalties amb alteració del sistema immunològic.
- Realitzar una mala complimentació de la medicació, no acudir de forma reiterada a les cites a la consulta sense justificació o demostrar poc interès en el tractament de la seva patologia.
- Haver rebut immunoteràpia en els últims 10 anys.
- Deteriorament de les mostres de CMN criopreservades.

3.1.3 GRUP DE INDIVIDUS NO AL·LÈRGICS

Per a comparar diversos paràmetres immunològics, a un grup de deu individus sans no atòpics (historia clínica no suggestiva d'al·lèrgia i proves cutànies a la bateria estàndard de pneumoal·lèrgens negatives), se'ls va realitzar una extracció sanguínia,

3.1.4 GRUP TRACTAMENT/GRUP CONTROL

Els 30 pacients inclosos es varen distribuir de forma aleatòria en dos grups, un que es va tractar amb immunoteràpia i un grup control sense immunoteràpia, per possibilitar una comparació entre els paràmetres avaluats: símptomes, proves de funció respiratòria, proves "in vivo" i determinacions "in vitro".

La distribució en els dos grups es va realitzar segons la data del dia d'inclusió a l'estudi: si era senar el pacient era inclòs en el grup amb IT, i si era parell, en el grup sense IT. Els dos grups resultants foren els següents:

- grup que seria tractat amb immunoteràpia: 16 pacients.
- grup sense tractament amb immunoteràpia: 14 pacients. Durant l'estudi

varen ser exclosos dos pacients del grup control, un per deteriorament de les aliquotes de CMN criopreservades de la primera mostra sanguínia obtinguda i l'altre per no acudir el pacient als controls, quedant el grup final amb 12 pacients.

3.2 MATERIAL

3.2.1 MATERIAL FUNGIBLE

- Extractes al·lergènics per a proves cutànies d'hipersensibilitat immediata (CBF Leti[®], Barcelona, Espanya ; Merck[®], Barcelona; Espanya)
- Extractes per a prova de provocació conjuntival (CBF-Leti[®], Barcelona, Espanya)
- Vacutainer[®] (Becton-Dickinson, San José, Califòrnia, EEUU)
- Heparina sòdica 1:1000 (Rovi[®] S.A., Laboratorios Farmacéuticos, Madrid, Espanya)
- Medi per a separació de cèl·lules mononuclears per densitat (Ficoll Paque[®], Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suècia)
- RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies LTI, Paisley, Escòcia, Regne Unit)
- Sèrum de fetus de vedella (fetal calf serum, FCS) (Gibco BRL, Life Technologies LTI, Paisley, Escòcia, Regne Unit)
- Mercapto-Etanol (Serva entwicklungslabor, Heidelberg, Alemanya)
- Dimetil sulfòxid (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EEUU)
- Vials Nunc CrioTube[™] (Nalge Nunc International, Dinamarca)
- Plaques de cultiu cel·lular de fons rodó de 24 pouets (Costar, Cambridge, Ma, EEUU)
- *Dermatophagoides pteronyssinus*, extracte liofilitzat (ALK-Abelló, Madrid,

Espanya)

- Toxoide Tetànic (CBF-LETI[®], Barcelona, Espanya)
- Phorbol 12-miristate 13 acetate (PMA) (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EEUU)
- Ionomicina (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EEUU)
- Brefeldin-A (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EEUU)
- Plaques de cultiu cel·lular 96 pouets (Costar, Cambridge, Ma, EEUU)
- Timidina tritiada (ICN Ibèrica, S.A., Barcelona, Espanya)
- Líquid d'espurneig
- Anticòs monoclonal anti-CD3-isotiocianat de fluoresceïna (FITC), anti-CD69-ficoeritrina (PE), anti-CD3-peridium chlorophyl protein (perCP), anti-CD8-FITC, anti-CD8-PE, anti-CD20-FITC, anti-CD20-PE, anti-CD14-PE, anti-CD14-FITC, anti-CD23-PE, anti-CD86-FITC (Becton-Dickinson, San José, Califòrnia, EEUU)
- Anticòs monoclonal anti-IL4-PE, anti-IFN γ -FITC, anti-IL-10-PE (PharMingen, San Diego, Califòrnia, EEUU)
- FACS[™] Lysing Solution (Becton-Dickinson, San José, Califòrnia, EEUU)
- Saponina (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EEUU)

3.2.2 MATERIAL NO FUNGIBLE

- Spiroanalyzer ST-250, Fukuda Sangyo.
- Centrífuga General Laboratori Centrifuge, Sorvall.

- Sistema de criopreservació cel·lular Cryoson MIC 15
- Tanc de nitrogen líquid
- Estufa Hereus Instruments
- Harvester Titertek
- Comptadora Beta
- FACS-scan Becton-Dickinson
- Ordinador Power Mackintosh G3

3.3 MÈTODES

3.3.1 TIPUS D'ESTUDI

El plantejament de l'estudi correspon a un estudi prospectiu, d'un any de duració, obert, amb grup amb tractament actiu amb IT i un grup control sense tractament amb IT. Es va fer un seguiment de paràmetres clínics i de laboratori.

En aquest treball es va considerar atòpia la presència de sensibilització a un al·lèrgen com a mínim, objectivat mitjançant proves cutànies o IgE específica en sèrum. L'expressió clínica d'aquesta sensibilització, en forma d'asma bronquial, rinitis al·lèrgica o dermatitis atòpica, va ser considerada al·lèrgia.

La història clínica va consistir en una anamnesi exhaustiva dels antecedents familiars i personals d'atòpia, i una valoració dels símptomes actuals de rinoconjuntivitis i asma bronquial.

Un sol investigador va dur a terme totes les avaluacions clíniques, proves "in vivo" i tècniques "in vitro" que es detallen a continuació.

3.3.2 PROVES "IN VIVO"

3.3.2.1 PROVES CUTÀNIES D'HIPERSENSIBILITAT IMMEDIATA

Per a la realització d'aquesta prova, el pacient havia d'interrompre la presa d'antihistamínics en els últims tres dies (30 dies en el cas de l'astemizol).

En la primera visita del pacient, es realitzaven proves cutànies amb la bateria estàndard de pneumoal·lèrgens que habitualment s'apliquen en els pacients afectes de patologia respiratòria en els que es desitja comprovar o descartar sensibilització al·lèrgica. Aquesta bateria inclou els pneumoal·lèrgens habituals en el nostre medi, i

s'hi afegien altres extractes si es sospitava que el pacient podia presentar al·lèrgia a algun d'ells. La bateria estàndard està composta per els següents extractes:

- *Dermatophagoides pteronyssinus*
- *Dermatophagoides farinae*
- *Alternaria*
- *Penicillium*
- *Aspergillus*
- *Cladosporium*
- Epiteli de gos
- Epiteli de gat
- Làtex
- Pol·len d'arbres grup I (*Betula verrucosa*, *Alnus glutinosa*, *Corylus avellana*, *Populus nigra*, *Ulmus minor*, *Salix sp*)
- Pol·len d'arbres grup II (*Acer pseudoplatanus*, *Acacia karoo*, *Fraxinus excelsior*, *Sambucus nigra*, *Platanus híbrida*, *Olea europea*)
- Pol·len de *Platanus híbrida*
- Pol·len de *Olea europea*
- Pol·len de *Cupressus sempervirens*
- Pol·len de gramínies (*Holcus lanatus*, *Dactylis glomerata*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense*, *Poa pratensis*, *Festuca pratensis*)
- Pol·len d'herbes (*Artemisia vulgaris*, *Chaenopodium album*, *Salsola kali*, *Taraxacum*, *Plantago lanceolata*)
- Pol·len de *Parietaria*
- Pol·len de *Mercurialis*

Com a control positiu es va utilitzar l'histamina a una concentració de 10 mg/ml, i com control negatiu, sèrum fisiològic glicerinat.

Les proves cutànies es realitzaven en el pla volar a l'avantbraç del pacient, en condicions asèptiques, mitjançant la tècnica de "prick". Els resultats es llegien passats 15 minuts, i es mesuraven els diàmetres perpendiculars de la pàpula induïda, calculant -se la mitjana. El control negatiu es precisava per a excloure la presència de dermatografisme.

Es considerava un resultat positiu la presència d'una pàpula igual o superior a la produïda per la histamina, sempre que el control negatiu no induís l'aparició de pàpula.

3.3.2.2 PROVES CUTÀNIES D'HIPERSENSIBILITAT IMMEDIATA A D pteronyssinus A DIFERENTS CONCENTRACIONS

Per a la realització d'aquesta prova, el pacient havia d'interrompre la presa d'antihistamínics en els últims tres dies (30 dies en el cas de l'astemizol).

En les tres visites de control es realitzà una prova cutània amb extracte de *Dermatophagoides pteronyssinus*, mitjançant la mateixa tècnica descrita en el punt anterior.

Es va efectuar a les concentracions de 0.1, 1, 10 i 100 HEP/ml (Histamin equivalent prick).

La lectura s'efectuava tal com s'ha explicat en l'apartat anterior. Com a control positiu es va utilitzar l'histamina 10 mg/ml, i com control negatiu, sèrum fisiològic glicerinat.

3.3.2.3 PROVES DE PROVOCACIÓ CONJUNTIVAL

A l'inici de l'estudi i en els controls als 6 i als 12 mesos es va realitzar una prova de provocació conjuntival a *D pteronyssinus*.

Per a la realització d'aquesta prova, el pacient havia d'interrompre la presa d'antihistamínics en els últims tres dies (30 dies en el cas de l'astemizol).

Es realitzà mitjançant la instil·lació d'una gota de solució, en concentracions creixents, d'un extracte per a prova conjuntival de *Dermatophagoides pteronyssinus* (0.1, 1, 10 i 100 HEP/ml). Com a control negatiu s'utilitzava sèrum fisiològic. Després de l'aplicació es llegia el resultat després de 15 minuts, considerant-se positiu si apareixia:

- Quemosi
- Eritema > 50% de superfície bulbar
- Eritema < 50% de superfície bulbar amb pruija o epífora

3.3.2.4 PROVES DE FUNCIÓ RESPIRATÒRIA

A tots els pacients es realitzà a l'inici, sis mesos i 12 mesos de l'estudi, una espirometria basal forçada amb prova broncodilatadora, després de l'administració de salbutamol inhalat.

Per a la realització d'aquesta prova, el pacient havia d'interrompre la presa de broncodilatadors inhalats de vida mitjana curta en les últimes 12 hores, i 24 hores en caso de broncodilatadors de vida mitjana llarga o sistèmics.

Per a l'espirometria basal forçada, s'efectuaven un mínim de tres maniobres considerades correctes, amb un esforç inspiratori i espiratori màxim per part del pacient, sense haver presentat tos ni tancament de glotis. Es va escollir la corba

obtinguda després del millor esforç.

Es van determinar els valors absoluts i relatius (comparats amb els valors de referència de controls sans segons sexe, edat, altura i pes) dels següents paràmetres:

- FVC (Capacitat vital forçada): volum màxim d'aire espirat amb esforç màxim forçat, partint des d'una inspiració màxima, expressada en litres.
- VEMS (Volum espirat màxim en un segon): volum d'aire espirat en el primer segon de la FVC.
- VEMS/FVC%: relació entre el volum d'aire espirat en el primer segon respecte a la FVC, expressat com percentatge.
- FEF 25-75%: flux espiratori forçat entre el 25 i el 75% de la FVC, expressat en litres/segon.
- Prova broncodilatadora: la diferencia s'expressa com a percentatge ponderat:

$$2 \times \frac{\text{postbroncodilatació} - \text{prebroncodilatació}}{\text{postbroncodilatació} + \text{prebroncodilatació}} \times 100$$

Es considerà positiva quan hi havia un increment del 10% del FVC, 15% del VEMS o del 49% del FEF 25-75.

3.3.3 TRACTAMENT AMB IT A *Dermatophagoides pteronyssinus* I SEGUIMENT

3.3.3.1 IMMUNOTERÀPIA A *Dermatophagoides pteronyssinus*

En el grup de pacients amb IT, aquest tractament fou realitzat amb un extracte

depot de *Dermatophagoides pteronyssinus* adsorbit en hidròxid d'alumini (Pangramin Depot[®], ALK-Abelló, Madrid, Espanya) valorat amb Unitats Biològiques i Unitats de Massa (10 BU/ml corresponent a 4 µg/ml de Der p I i 2 µg/ml de Der p II). Fou aplicada, segons les recomanacions del "Comité de Inmunoterapia de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica"²⁶⁵, seguint la pauta que s'indica en la Taula 8. Un cop assolida la dosi màxima de manteniment, s'aplicà una dosi quinzenal i és deixà una dosi de manteniment mensual.

Taula 8. Pauta d'inici d'administració de la IT

FLASCÓ 1 (0.1 BU/ml)	FLASCÓ 2 (1 BU/ml)	FLASCÓ 3 (10 BU/ml)
0.1 ml setmanal	0.1 ml setmanal	0.1 ml setmanal
0.2 ml setmanal	0.2 ml setmanal	0.2 ml setmanal
0.4 ml setmanal	0.4 ml setmanal	0.4 ml setmanal
0.8 ml setmanal	0.8 ml setmanal	0.6 ml setmanal
		0.8 ml setmanal

Abans d'administrar la IT és comprovava l'estabilitat clínica del malalt. L'administració es realitzava per injecció subcutània en el braç, a la zona equidistant entre el colze i l'espatlla, alternant el braç en cada administració. El pacient es mantenia en observació a la consulta durant 30 minuts, moment en que es revisava la situació clínica del pacient per objectivar possibles reaccions locals o sistèmiques immediates.

3.3.3.2 SEGUIMENT DE LA IMMUNOTERÀPIA

Els pacients que varen assolir la dosi de 0.8 ml del vial 3 (10 BU/ml de potència),

varen continuar amb aquesta dosi de manteniment d'administració mensual. Quan es produïa una reacció local superior a 5 cm de diàmetre, es repetia en tres ocasions la dosi anterior tolerada i s'intentava de nou incrementar la dosi. Si no era possible, es deixava aquesta darrera com a dosi mensual de manteniment. Si el pacient presentava símptomes sistèmics, també es paütava la dosi tolerada com a manteniment.

3.3.3.3 CONTROL CLÍNIC

Tots els pacients van ser visitats per un mateix metge i se'ls va aplicar un mateix qüestionari d'història clínica. Els controls estandarditzats es realitzaven a l'iniciar el protocol de l'estudi (T1), després de 6 mesos d'inici de l'immunoteràpia (T2) i a l'any (T3). Aquests controls incloïen: entrevista amb el metge que valorava la situació clínica i la pauta de medicació, autoavaluació de símptomes i medicació per part del pacient, proves de funció respiratòria, prova cutània d'hipersensibilitat immediata a *D pteronyssinus* a diverses concentracions i prova de provocació conjuntival. Entre aquestes visites, si l'estat del pacient ho requeria, s'indicaven citacions a la consulta més freqüents per reavaluar el tractament.

3.3.3.4 SÍMPTOMES

Els pacients rebien uns fulls d'autoavaluació de símptomes (Annex 1). Havien de completar-lo un cop per setmana, atribuint una puntuació mitja entre 0 i 6, segons una escala establerta i utilitzada per altres autors²⁶⁶ (corresponent el 0 a cap símptoma, i 6 a simptomatologia màxima incapacitant), per a cada símptoma durant aquella setmana i guardar-los fins a la propera visita, quan eren entregats al metge. Amb aquestes puntuacions es calculava una mitjana setmanal corresponent al període de temps des del control previ.

3.3.3.5 MEDICACIÓ

Els pacients d'ambdós grups, podien continuar el tractament antiastmàtic i per a rinoconjuntivitis prescrit, segons necessitat. Havien d'anotar setmanalment, en un formulari mencionat prèviament (Annex 1), l'ús i dosi de cada tractament pautat fix (corticoides inhalats, cromones, etc.), així com la necessitat de medicació de rescat com broncodilatadors, antihistamínics, etc. La escala per avaluar l'ús de medicació es modificà a partir de la utilitzada per Creticos *et al*²⁶⁶. Amb aquestes puntuacions es realitzava un còmput corresponent a la mitjana setmanal durant el període des de l'últim control.

3.3.3.6 MILLORANÇA

Els estudis que es publiquen sobre l'eficàcia de la immunoteràpia habitualment valoren els resultats clínics amb escales de puntuació de símptomes i medicació, i comparen aquestes puntuacions abans i després del tractament amb IT, però no sempre estipulen a partir de quin grau es considera una variació significativa.

Per a establir un criteri de milloria o no, es va atribuir per a cada pacient un paràmetre que es va anomenar *millorança*. Es va establir de forma arbitrària que un pacient havia millorat si al final de l'estudi havia disminuït en una tercera part la simptomatologia o el consum de medicació. Així, independentment que hagin rebut IT o no, es van poder analitzar tots els paràmetres comparant el grup dels pacients que havien millorat o no.

3.3.4 PROVES “IN VITRO”

3.3.4.1 EXTRACCIÓ SANGUÍNIA

Per a l'estudi “in vitro”, es va procedir a obtenir sang perifèrica de tots els pacients. Es realitzava a l'inici de l'estudi (T1), al cap de sis mesos (T2) i a l'any (T3), moment en que es finalitzà l'estudi, coincidint amb la visita d'avaluació clínica.

L'extracció es realitzava abans d'administrar la dosi d'immunoteràpia, en el 2on i 3er període de control de l'estudi (T2 i T3, respectivament) en els pacients del grup amb tractament amb IT, el que suposa que l'última injecció s'havia aplicat un mes abans.

El pacient es citava a primera hora del matí i l'extracció sanguínia es realitzava a la Consulta Externa de Al·lèrgologia de l'Hospital General de la Vall d'Hebron, Barcelona. En condicions d'asèpsia es duia a terme una venipunció amb el sistema Vacutainer, i la mostra sanguínia era distribuïda en diferents tubs estèrils:

- 25-30 ml de sang es recollien en tubs al buit heparinitzats amb Heparina sòdica per la realització de les tècniques cel·lulars.
- 4 ml de sang s'obtenien en un tub anticoagulat amb EDTA, per determinar els leucòcits totals i la fórmula diferencial.
- 7ml passaven a un tub amb gel coagulator per obtenir sèrum. El sèrum era conservat mitjançant congelació. Posteriorment, es determinava la IgE total i la IgE específica sèrica a *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Un cop obtinguda la mostra, es procedia al transport de les mostres heparinitzades, a temperatura ambient, al laboratori d'Immunologia de l'Hospital Duran i Reynals, Ciutat Sanitària Universitària de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat. Les altres

tècniques es realitzaven al laboratori de l'Hospital General de la Vall d'Hebron.

3.3.4.2 QUANTIFICACIÓ D'IgE TOTAL I ESPECÍFICA

Tant la quantificació de la IgE total com de la IgE específica per *Dermatophagoides pteronyssinus* s'efectuava mitjançant la tècnica de CAP-system (Pharmacia®).

El sistema CAP és un fluoro-immuno assaig. Un anticòs anti-IgE o un al·lergen determinat (en funció de si es vol quantificar la IgE total o una IgE específica), està unit a un dispositiu denominat ImmunoCAP. Aquest ImmunoCAP s'incuba durant 30 minuts amb 50 µL de cada un dels estàndards, del control i de les mostres de sèrum problema. Després d'un rentat, s'afegeixen 50 µL d'una barreja específica d'anticossos immunoadsorbents (policlonals de conill i monoclonals de ratolí) anti-IgE humana marcats amb β-galactosidasa. S'incuba durant 150 minuts per permetre l'unió d'aquests anticossos a la IgE de la fase sòlida. Després d'un nou rentat, s'afegeix el substrat 4-metilumbeliferril-β-D-galactòsid, i després de 10 minuts, es para la reacció. La fluorescència que apareix és llegida a 450 nm en un fluoròmetre amb una amplitud d'ona d'excitació de 365 nm. La corba estàndard es calibra comparant amb l'estàndard de la OMS per IgE total o amb una corba realitzada amb un al·lergen estandarditzat. El rang de quantificació d'IgE específica és de 0,35 a 100 kU/l. El rang de quantificació de la IgE total és de 10 a 4000 kU/l. Si la IgE de la mostra es troba per sobre d'aquests valors s'ha de procedir a fer dilucions.

3.3.4.3 TÈCNiques CEL·LULARS

3.3.4.3.1 Determinació de leucòcits i fórmula leucocitària

Mitjançant un sistema automatitzat de comptatge cel·lular (Coulter Gen S™, Beckman) es determinava el nombre total de leucòcits en sang, i la fórmula diferencial, indicant entre d'altres el percentatge i el nombre total de limfòcits i

eosinòfils.

3.3.4.3.2 Separació cel·lular

Amb la finalitat d'obtenir cèl·lules mononuclears (CMN) de sang perifèrica, la mostra sanguínia heparinitzada, en condicions totalment estèrils era diluïda al 1:3 en RPMI 1640. En tubs estèrils de fons rodó es col·locaven 3 ml de Ficoll, i al damunt sense alterar la interfase, la dilució de sang heparinitzada. Les cèl·lules mononuclears s'aïllaven mitjançant un gradient de densitat (densitat 1077 g/ml), centrifugant a 400 g durant 30 minuts a temperatura ambient. La interfase de cèl·lules mononuclears es recollia amb una pipeta Pasteur. A continuació, es realitzaven dos rentats amb medi RPMI 1640 i un tercer amb medi de cultiu complet (MCC), consistent en RPMI 1640 amb 2mM l-glutamina suplementat amb sèrum de fetus de vedella al 10%, estreptomicina (100 µg/ml) i penicil·lina (100 U/ml), centrifugant cada vegada a 400 g durant 10 minuts. Finalment, el "botó" de cèl·lules resultant era resuspès en 2 ml de MCC.

3.3.4.3.3 Estudi de viabilitat i quantificació de la concentració cel·lular

Es realitzava amb el mètode d'exclusió amb tinció blau Tripà en càmera de Neubauer i comptatge per microscopia òptica.

El blau Tripà és un colorant que penetra a l'interior de les cèl·lules mortes. La diferent coloració que presenten aquestes cèl·lules respecte a les viables, permet quantificar la viabilitat cel·lular. A 10 µL de suspensió cel·lular, s'afegien 10 µL de blau Tripà i abans de 10 minuts es procedia al comptatge dels limfòcits.

La càmera de Neubauer és un portaobjectes dissenyat per contenir un volum determinat i amb una quadrícula que facilita el comptatge dels elements. Per extrapolació, es pot calcular la concentració de cèl·lules en la suspensió i el

percentatge de viabilitat.

El percentatge de cèl·lules viables s'obtenia dividint el nombre de cèl·lules viables pel nombre total de cèl·lules i multiplicant per cent. Es va considerar acceptable una viabilitat superior al 80%.

3.3.4.3.4 Criopreservació cel·lular

Amb el propòsit de poder realitzar les proves "in vitro" de les tres mostres sanguínies d'un pacient al mateix temps, i obviar d'aquesta forma els possibles biaixos derivats de la realització de les tècniques en distint moment, es va procedir a la criopreservació de les cèl·lules. Per això, les cèl·lules es resuspenien en MCC amb dimetil-sulfòxid al 10% i s'aliquotaven en vials de criopreservació d'1 ml (Nunc), prèviament rotulats per a la seva posterior identificació. La congelació a -120°C es va efectuar amb un sistema de criopreservació cel·lular Cryoson, controlat per un programa informàtic que permet efectuar una congelació grau a grau. Un cop finalitzat el programa, els tubs que contenien les cèl·lules eren conservats en un tanc de nitrogen líquid a -196°C .

3.3.4.3.5 Descongelació cel·lular

En el moment de la seva utilització, les alíquotes de cèl·lules eren descongelades ràpidament en un bany d'aigua a 37°C en agitació. Un cop descongelades, es procedia a realitzar un rentat i resuspensió en MCC, analitzant de nou la viabilitat cel·lular.

Un cop descongelades les cèl·lules i analitzada la viabilitat cel·lular, es procedia de forma immediata a la realització de les tècniques que es descriuen a continuació.

3.3.4.3.6 Citometria de flux

La citometria de flux es basa en l'anàlisi cèl·lula a cèl·lula de cèl·lules sanguínies que travessen un raig làser (488 nm). El llum làser és desviat en diferents angles, depenent del tamany i de la complexitat citoplasmàtica de la cèl·lula. L'ús de citòmetres equipats amb dos o tres fotomultiplicadors permet l'anàlisi de fluorescència emesa per fluorocroms específics, que són utilitzats per marcar anticossos monoclonals (AcMo). Aquests AcMo es generen per reconèixer diferents molècules, com per exemple les marcadores dels "cluster differentiation" (CD)²⁶⁷ o inclús molècules de l'interior del citoplasma cel·lular com citocines.

Després de la incubació de la mostra cel·lular amb els AcMo marcats amb fluorocroms dirigits contra les molècules que interessa estudiar, es procedeix a l'adquisició en el citòmetre de la suspensió cel·lular. En aquest estudi es va emprar el citòmetre FACS-scan (Becton-Dickinson, San José, Califòrnia, EEUU). Quan el raig làser impacta sobre una cèl·lula es registra un senyal de llum per l'instrument. La cèl·lula que ha interaccionat amb la llum làser actua com una lent esfèrica i dispersa la llum en totes les direccions. La llum dispersada és recollida per uns sistemes detectors situats al davant de la direcció del trajecte del raig en els angles propers a 0° (angle davanter de dispersió de la llum o "forward-angle light scatter" – FSC-) i en l'angle recte de la direcció del trajecte (llum dispersada 90° o "side scatter" -SSC-). La intensitat del senyal FSC és directament proporcional al volum de la cèl·lula que és mesurada, mentre que el senyal de la llum dispersada a l'angle de 90° (SSC), és directament proporcional al volum de la cèl·lula, però és afectada també per altres paràmetres com és la granularitat, la topografia de la superfície, la relació nucli-citoplasma i la homogeneïtat del citoplasma cel·lular. Si la cèl·lula és lligada a un o més fluorocroms, aquests emeten llum en ésser excitats pel làser també en totes direccions. Mitjançant un sistema òptic, es direcciona la llum a una

sèrie de tubs fotomultiplicadors que permeten la seva anàlisi.

L'integral de l'impuls elèctric que és generat, és digitalitzada i guardada o analitzada informàticament.

Utilitzant un programa informàtic específic, es duu a terme l'anàlisi estadístic de diferents paràmetres, com és el recompte d'elements i el percentatge d'expressió de cadascun dels fluorocroms. En aquest estudi el processament de les dades es va realitzar mitjançant el programa informàtic Cell Quest (Becton-Dickinson, San José, Califòrnia, EEUU) en un ordinador personal Macintosh.

El primer pas en aquesta tècnica consisteix en seleccionar una "finestra" o "gate", corresponent a la població cel·lular que ens interessa estudiar, que correspon a una zona determinada de la distribució morfològica i de tamany de les cèl·lules en un citograma en funció dels senyals recollits en forma lineal tant del FSC (eix horitzontal) com del SSC (eix vertical) (Fig. 13 i 14)). La localització de la població limfocitària i dels monòcits és ben coneguda. El marcatge amb diferents AcMo permet seleccionar les poblacions corresponents a limfòcits T CD4+ o CD8+, monòcits, etc., en els quals s'ha estudiat l'expressió de marcadors d'activació (com el CD69), molècules de superfície (com el CD23) o citocines intracel·lulars, mitjançant la utilització de tres fluorocroms. La comparació amb mostres similars marcades amb controls negatius d'isotip (IgG1/IgG1) permet situar els eixos en els citogrames per realitzar els càlculs estadístics, i eliminar la fluorescència no específica.

A continuació es mostren exemples dels citogrames i de l'anàlisi d'expressió de les diferents molècules, segons els fluorocroms detectats (Figs. 13- 31).

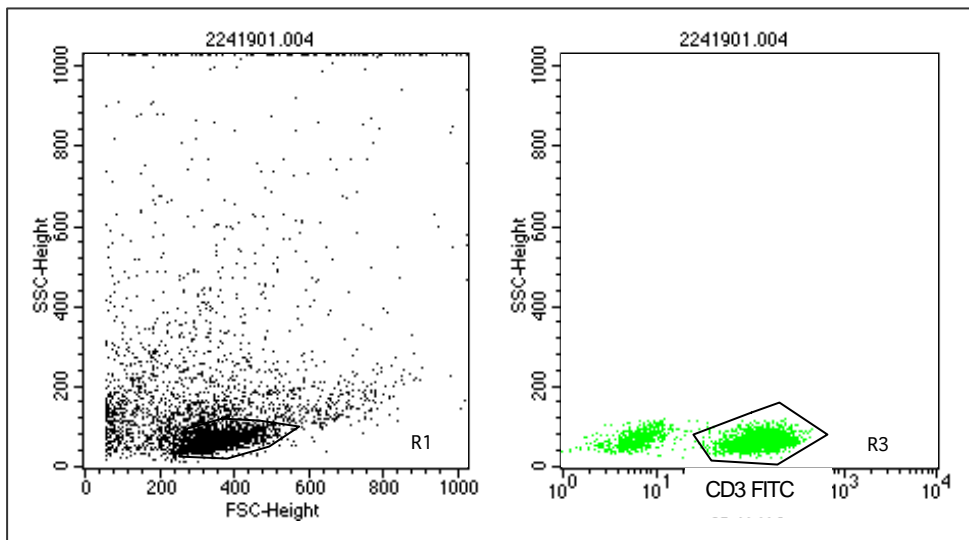


Figura 13. Citometria: limfòcits CD3+ en CMN estimulades amb PMA+I

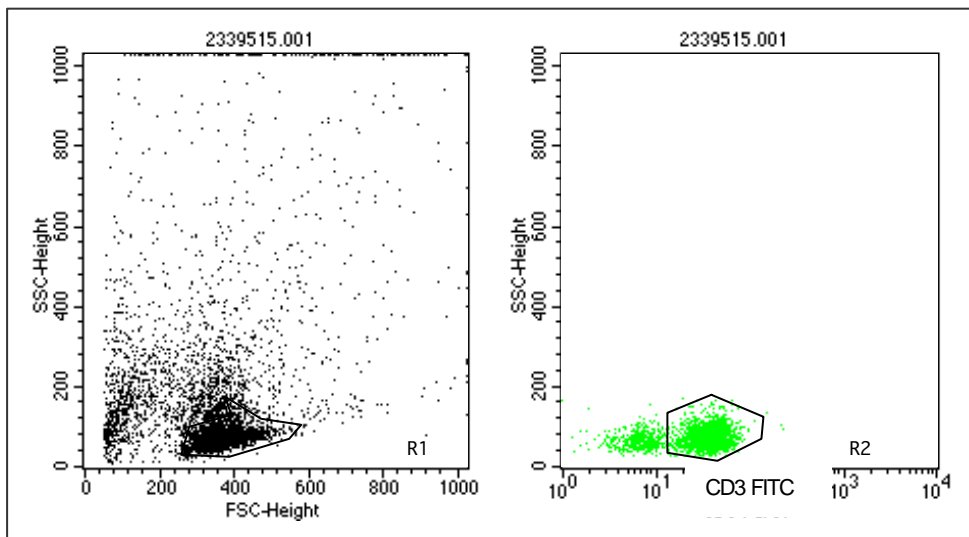


Figura 14. Citometria: limfòcits CD3+ en cultiu amb *D pteronyssinus* i reestimat amb PMA+I

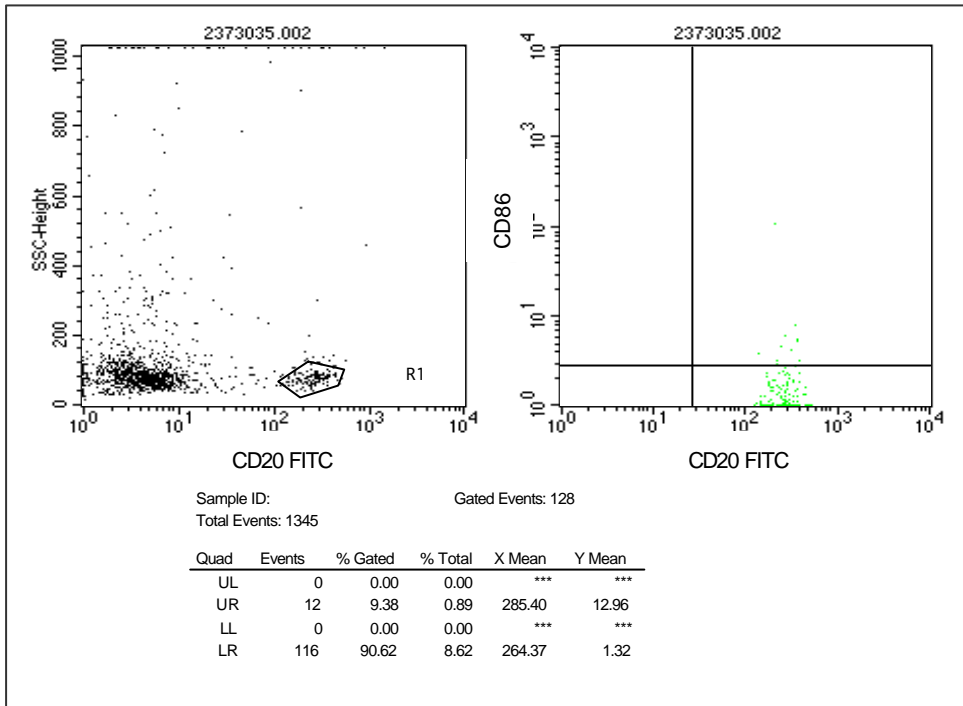


Figura 15. Citometria: percentatge de cèl·lules CD20+ que expressen CD86 en CMN

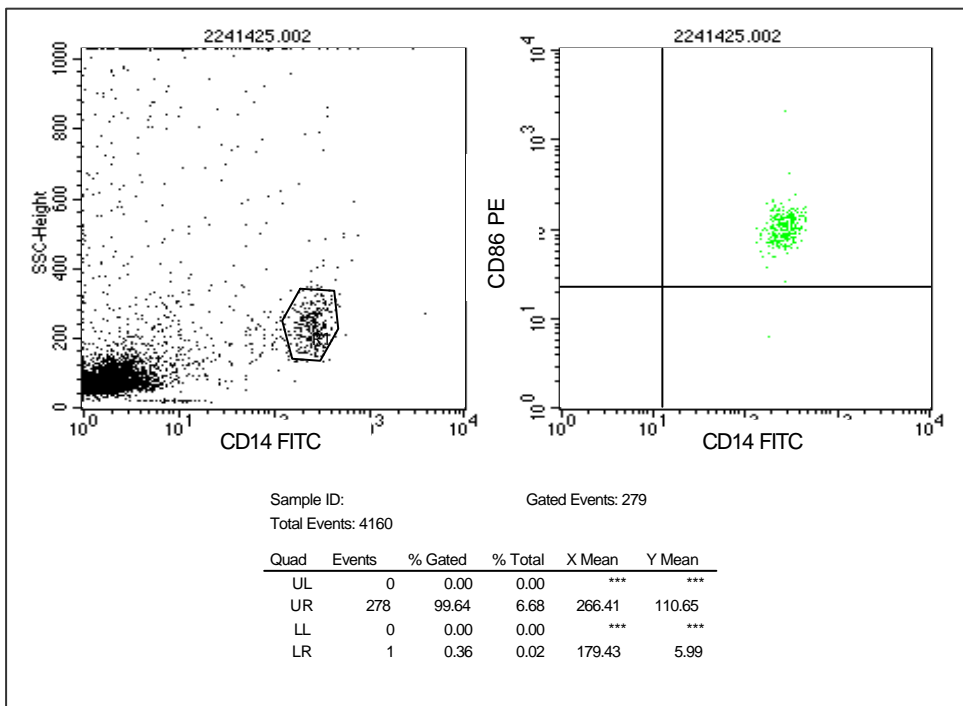


Figura 16. Citometria: percentatge de cèl·lules CD14+ que expressen CD86 en CMN

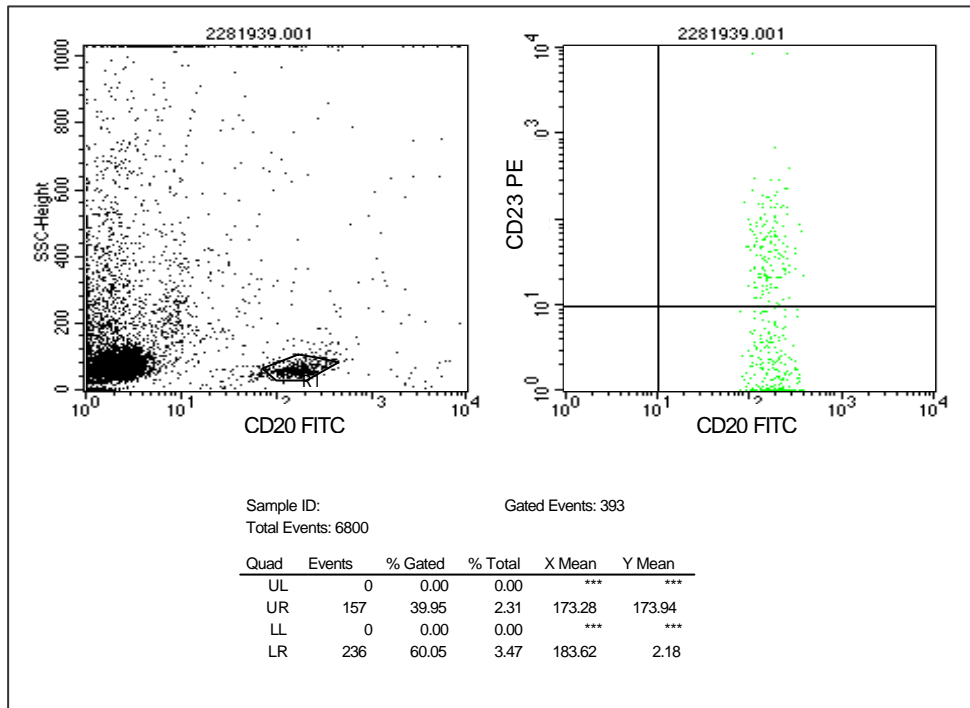


Figura 17. Citometria: percentatge de cèl·lules CD20+ que expressen CD23 en CMN

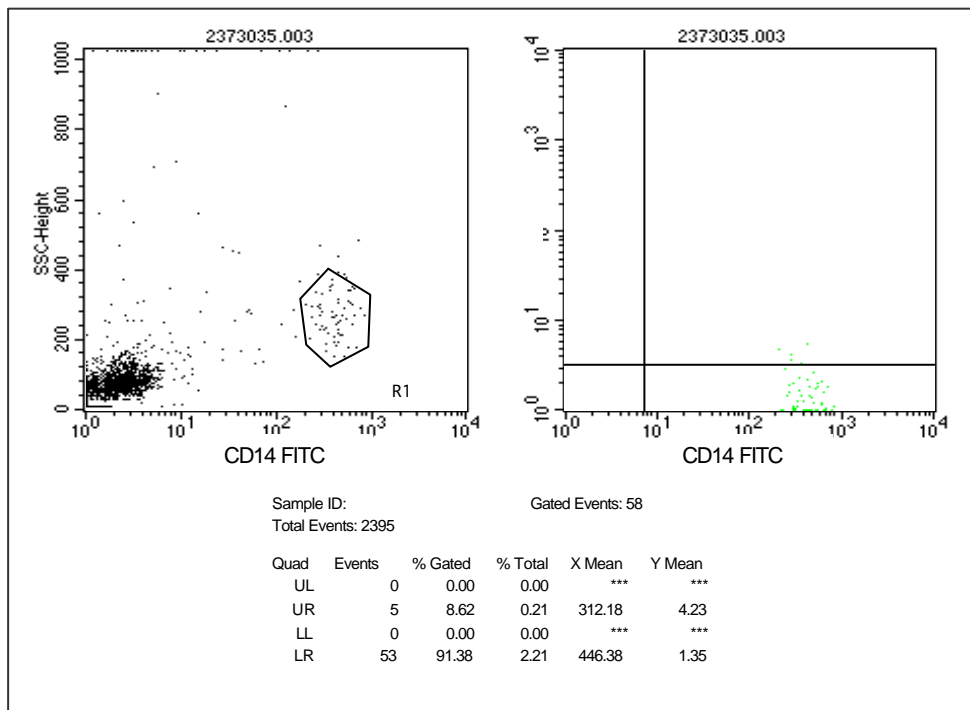


Figura 18. Citometria: percentatge de cèl·lules CD14+ que expressen CD23 en CMN

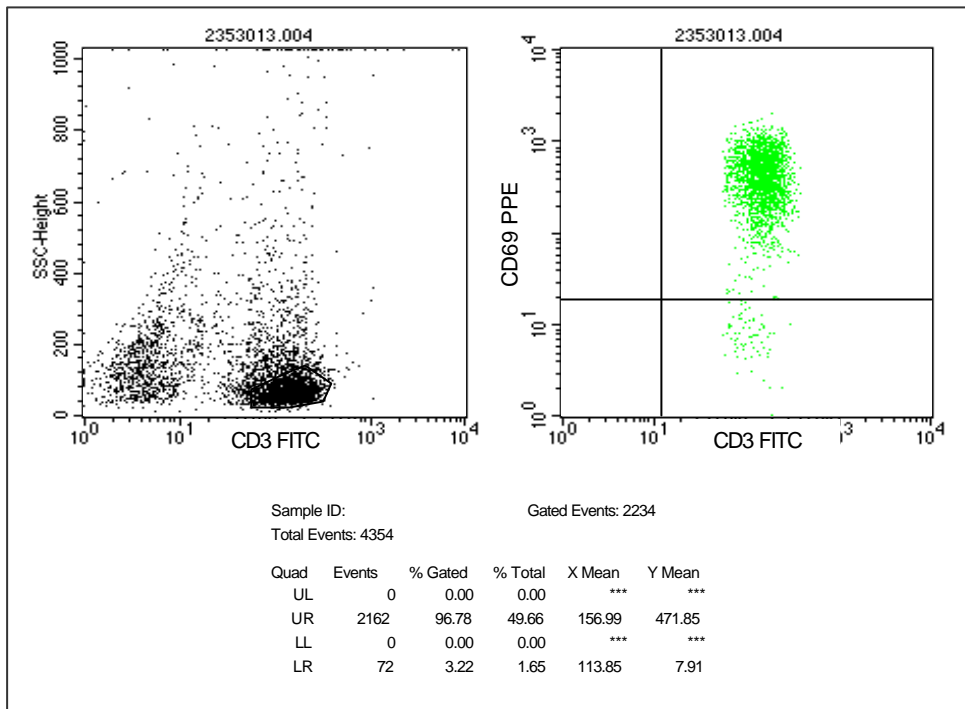


Figura 19. Citometria: percentatge de cèl·lules CD3+ que expressen CD69 en CMN estimulades amb PMA+I

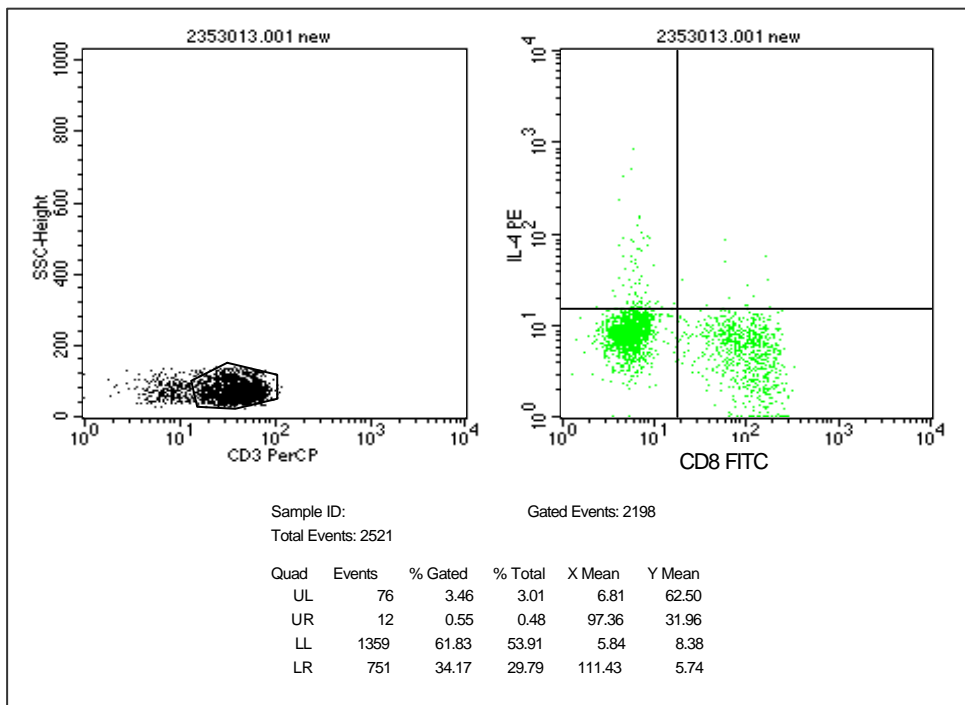


Figura 20. Citometria: percentatge de cèl·lules CD3+CD8+ que expressen IL-4 en CMN estimulades amb PMA+I

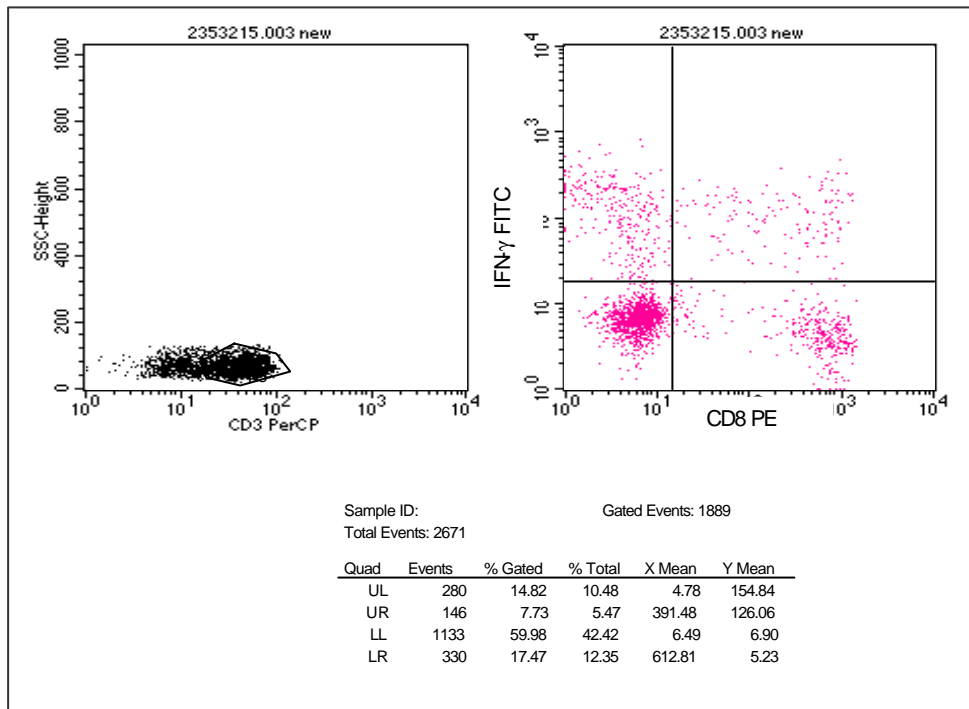


Figura 21. Citometria: percentatge de cèl·lules CD3+CD8+ que expressen IFN- γ en CMN estimulades amb PMA+I

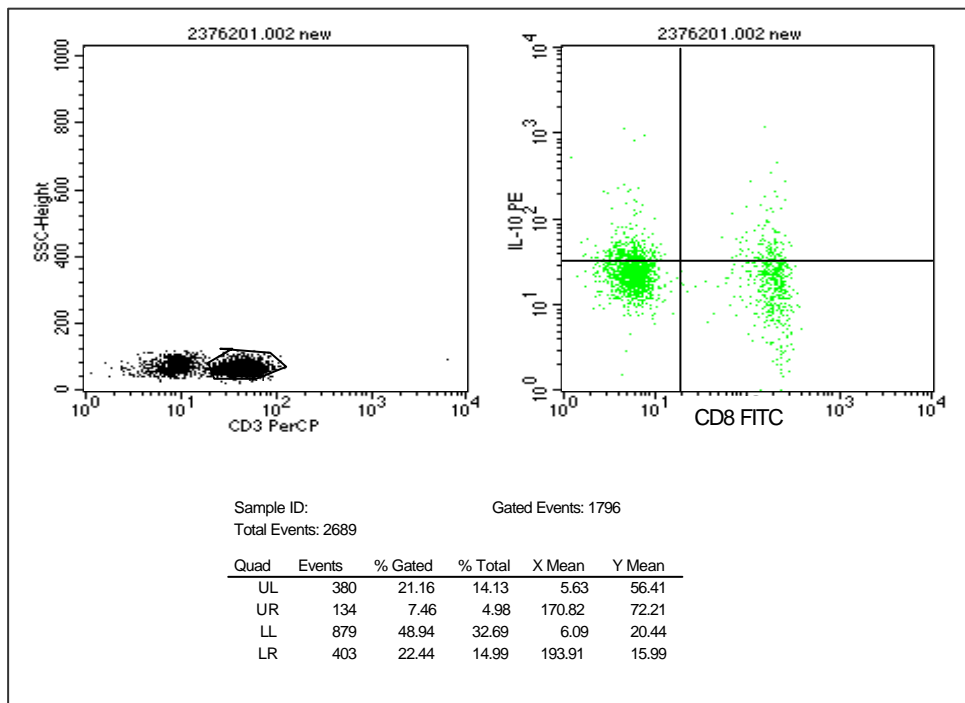


Figura 22. Citometria: percentatge de cèl·lules CD3+CD8+ que expressen IL-10 en CMN estimulades amb PMA+I

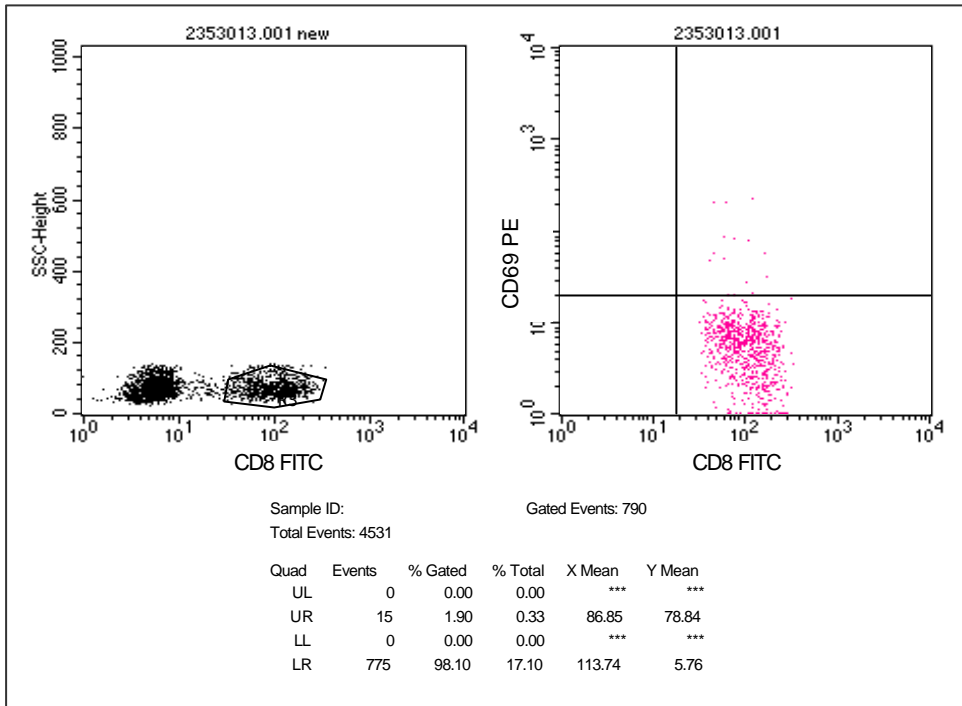


Figura 23. Citometria: percentatge de cèl·lules CD3+ que expressen CD69 en CMN de cultiu sense re-estimar

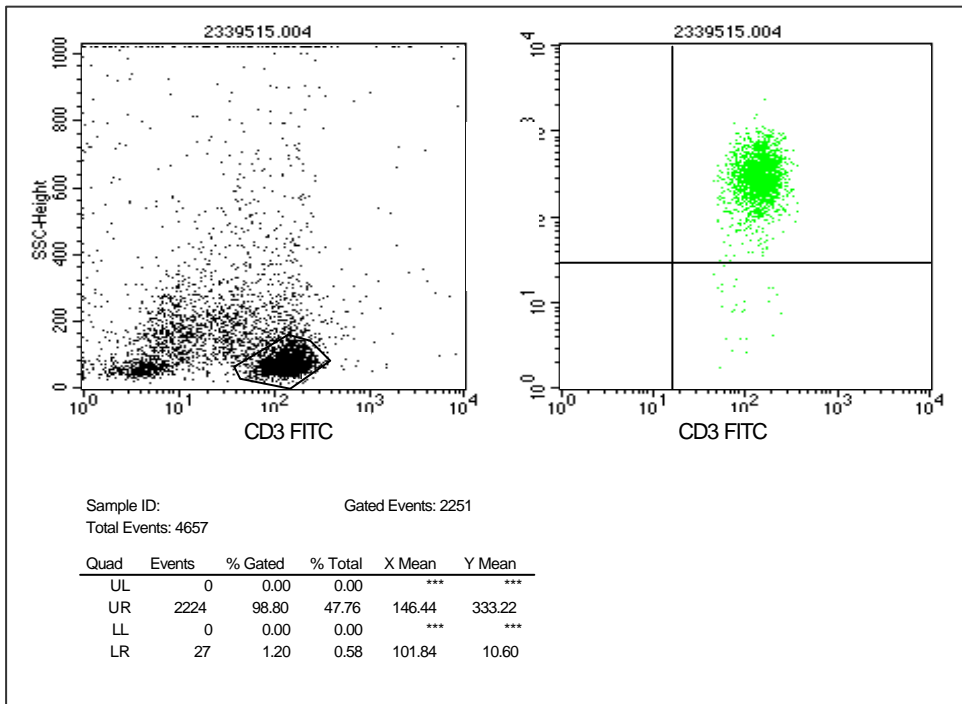


Figura 24. Citometria: percentatge de cèl·lules CD3+ que expressen CD69 en cultiu de CMN control (sense *D pteronyssinus*) re-estimat

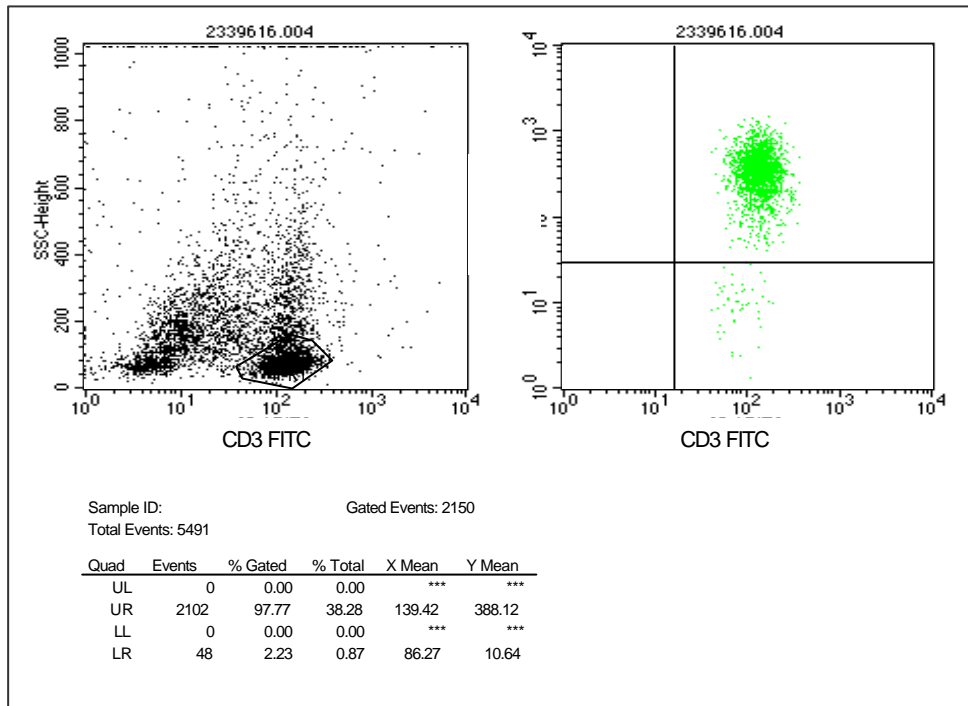


Figura 25. Citometria: percentatge de cèl·lules CD3+ que expressen CD69 en cultiu de CMN amb *D pteronyssinus* re-estimulat

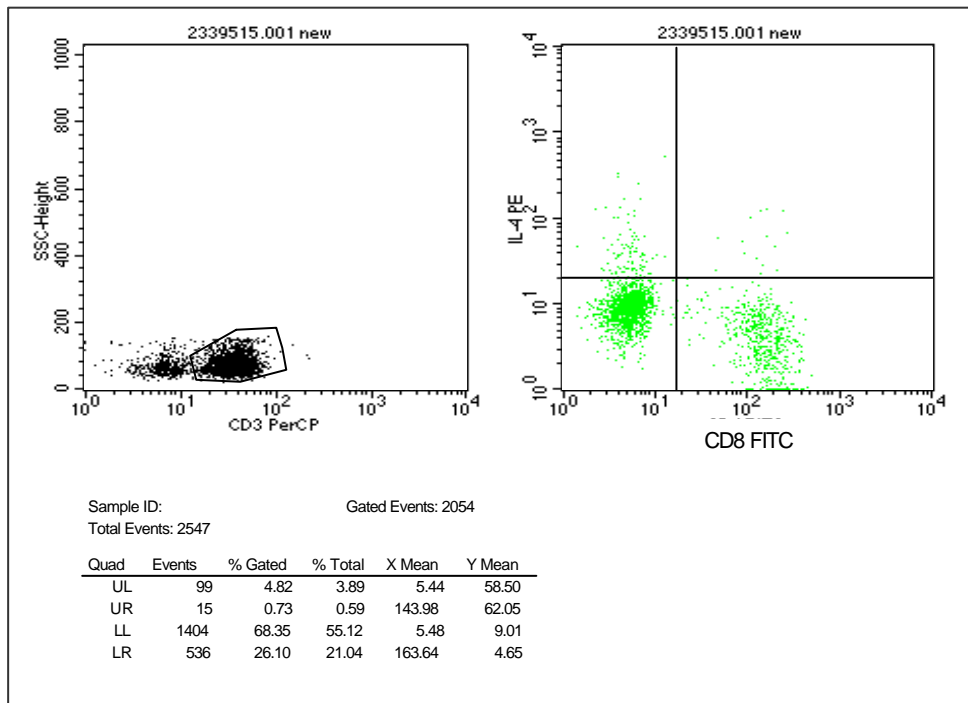


Figura 26 . Citometria: percentatge de cèl·lules CD3+CD8+ que expressen IL-4 en cultiu de CMN control (sense *D pteronyssinus*) re-estimulat

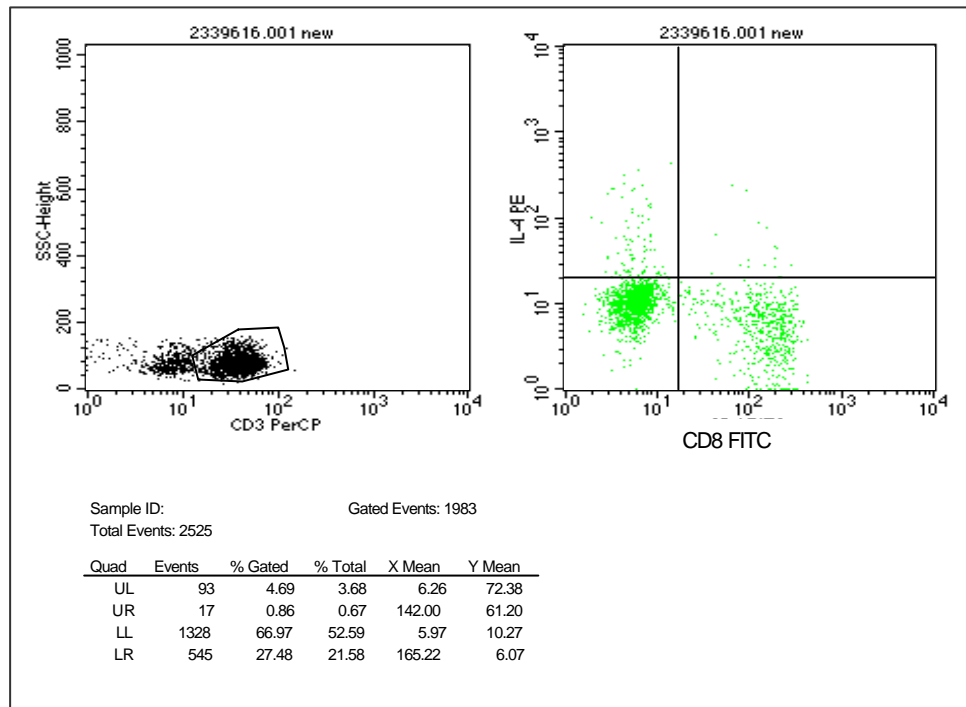


Figura 27. Citometria: percentatge de cèl·lules CD3+CD8+ que expressen IL-4 en cultiu de CMN amb *D pteronyssinus* re-estimulat

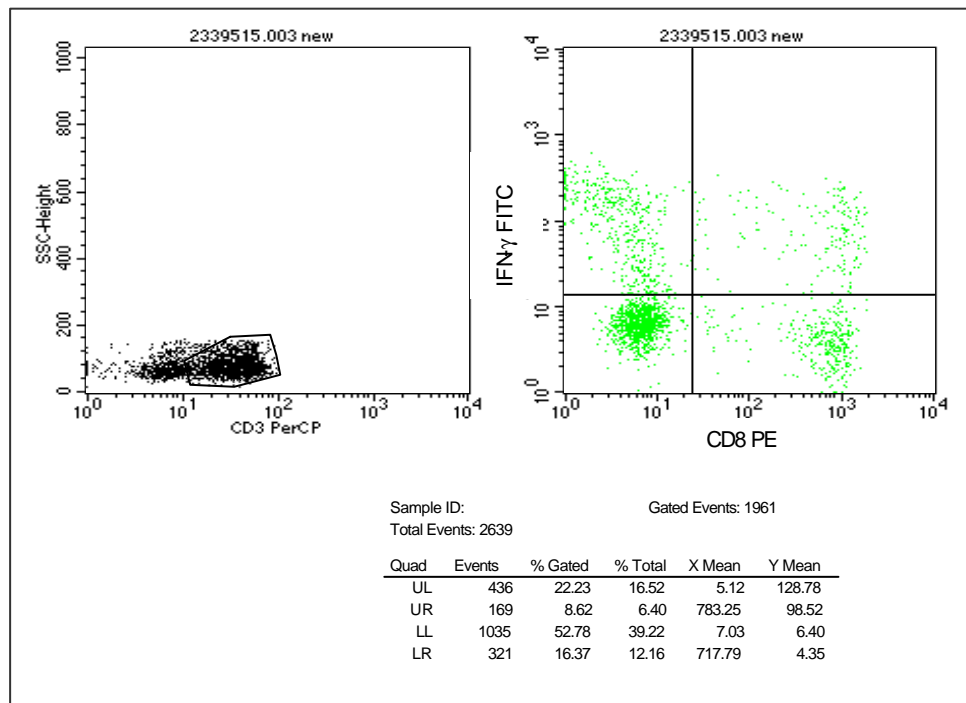


Figura 28. Citometria: percentatge de cèl·lules CD3+CD8+ que expressen IFN- γ en cultiu de CMN control (sense *D pteronyssinus*) re-estimulat

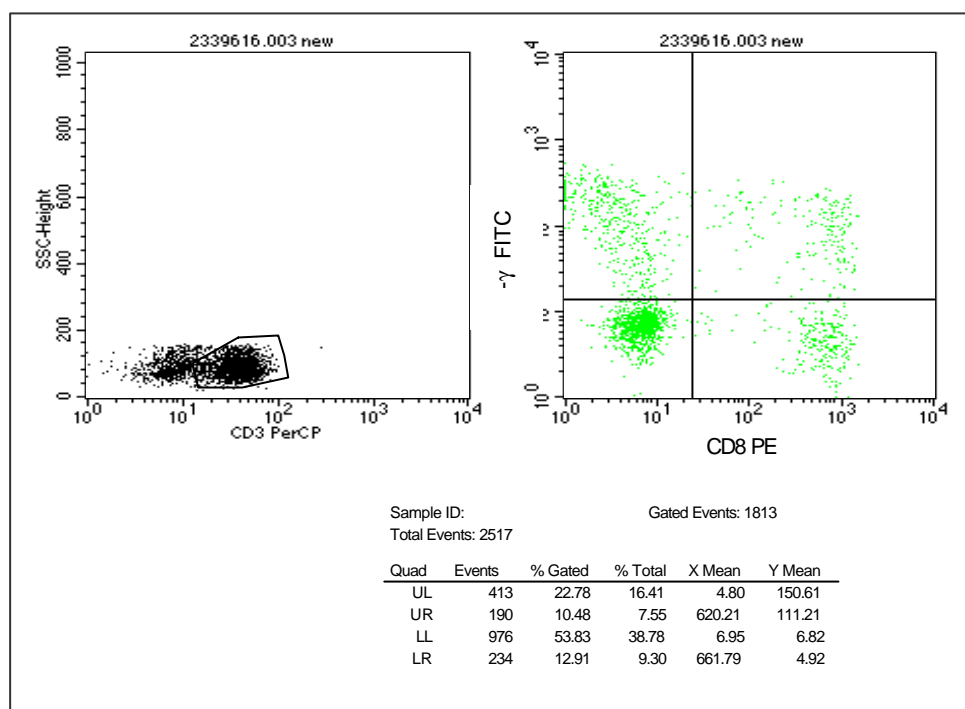


Figura 29. Citometria: percentatge de cèl·lules CD3+CD8+ que expressen IFN- γ en cultiu de CMN amb *D pteronyssinus* re-estimulat

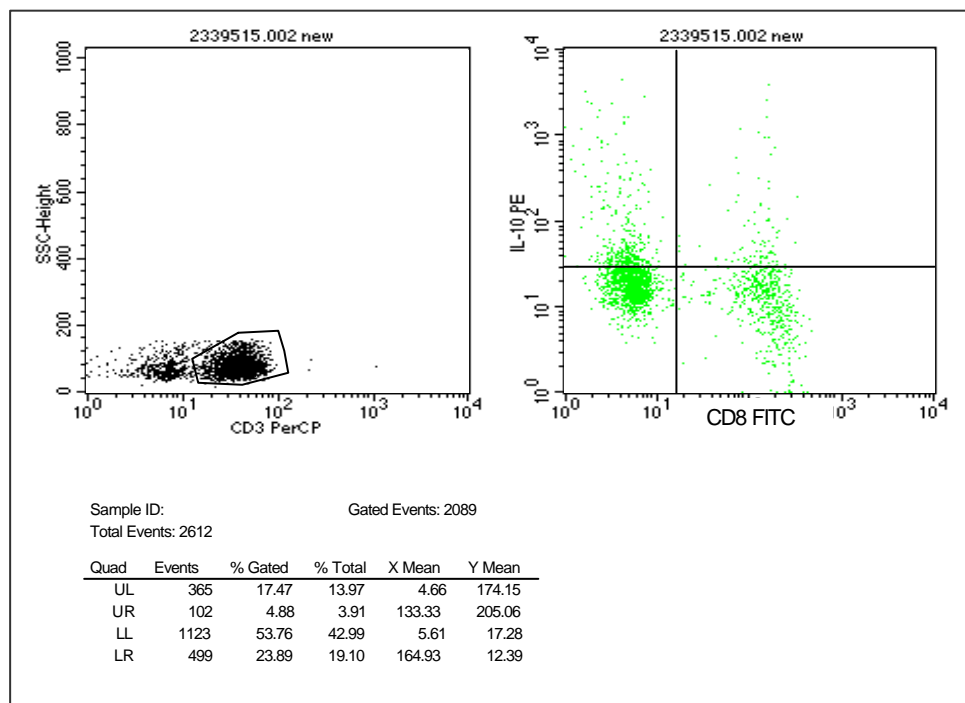


Figura 30. Citometria: percentatge de cèl·lules CD3+CD8+ que expressen IL-10 en cultiu de CMN control (sense *D pteronyssinus*) re-estimulat

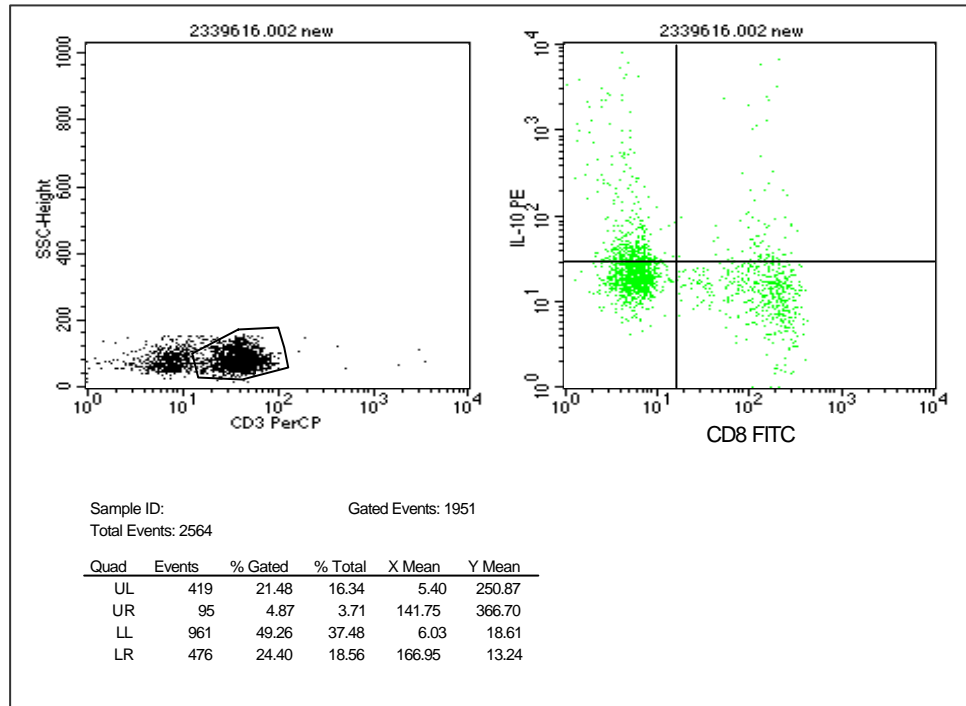


Figura 31. Citometria: percentatge de cèl·lules CD3+CD8+ que expressen IL-10 en cultiu de CMN amb *D pteronyssinus* re-estimulat

3.3.4.3.7 Estudi de l'expressió de CD23 i CD86 en CPA

Aquest estudi es va efectuar utilitzant AcMo marcats amb fluorocroms ficoeritrina (PE) o isoticianat de fluoresceïna (FITC) per citometria de flux.

Per a la determinació de l'expressió de CD23 i CD86 en monòcits i en limfòcits B, s'incubaren 100 µl de cada mostra de suspensió cel·lular amb AcMo anti-CD14 (monòcits) o anti-CD20 (limfòcits B) i anti-CD-23 o anti-CD-86, durant 20 minuts. Posteriorment es lisava i fixava la mostra amb solució lisant (FACs lysing solution) durant 10 minuts, segons la tècnica recomanada per Becton Dickinson i es resuspensia en solució salina tamponada amb fosfat (PBS) amb paraformaldehid al 4%, després d'un rentat amb PBS.

La suspensió cel·lular s'adquiria en el citòmetre per tal de procedir a la seva anàlisi mitjançant un programa informàtic. En el citograma, s'acotava la població corresponent als limfòcits i d'aquests es seleccionaven, en funció del fluorocrom, els CD20 positius, o bé, s'acotava la població corresponent als monòcits i d'aquests es seleccionaven els CD14 positius. S'estudiava en aquestes cèl·lules el percentatge que expressaven CD23 i CD86.

3.3.4.3.8 Estudi de l'expressió intracel·lular d'IL-4, IL-10 i IFN-γ en limfòcits T

En tots els subjectes de l'estudi i en els diferents períodes estudiats es va procedir a la detecció de citocines intracel·lulars en cèl·lules T estimulades de forma inespecífica amb PMA i ionomicina. S'ha realitzat segons la tècnica descrita per Jung *et al.* amb modificacions²⁶⁸.

3.3.4.3.8.1 Estimulació inespecífica amb PMA i ionomicina

Les CMN a una concentració de 2×10^6 cèl·lules/ml es van estimular amb PMA (50 ng/ml) i ionomicina (1 µg/ml). Per afavorir l'acumulació de citocines, s'utilitzà

brefeldin-A a una concentració de 10 µg/ml com a inhibidor del transport intracitoplasmàtic. La suspensió cel·lular es va incubar durant 4 hores en una estufa a 37°C en una atmosfera saturada d'aigua amb 5% de CO₂.

3.3.4.3.8.2 Detecció de citocines intracel·lulars

Per tal de determinar l'expressió intracel·lular de IL-4, IL-10 i IFN-γ, es va estandaritzar prèviament la tècnica que es detalla a continuació.

Un cop transcorregudes 4 hores, les CMN estimulades amb PMA + I, s'incubaven amb AcMo anti-CD3-perCP i anti-CD8-FITC o PE amb l'objectiu de poder detectar els limfòcits CD8+, o bé, amb anti-CD3-FITC durant 20 minuts. Posteriorment es fixaven les cèl·lules amb solució lisant/fixadora durant 10 minuts i se centrifugava a 400 g durant 5 minuts. Se realitzava un rentat amb 1% FCS en PBS. A continuació, s'incubaven amb saponina al 0.5% en 1% FCS en PBS durant 20 minuts, a 4° C, per permeabilitzar la membrana citoplasmàtica i permetre l'entrada dels AcMo anti citocines. Es realitzava un rentat amb saponina al 0,1%. Després s'incubaven durant 30 minuts a 4° C amb AcMo corresponent a la citocina que es pretenia analitzar (anti-IL-4-PE, anti-IFN-γFITC, anti-IL10-PE) o bé amb anti-CD69-PE (marcador d'activació cel·lular). L'últim rentat s'efectuava amb Saponina al 0,1%, i es resuspenien les cèl·lules en PBS amb paraformaldehid al 4% (Fig. 32).

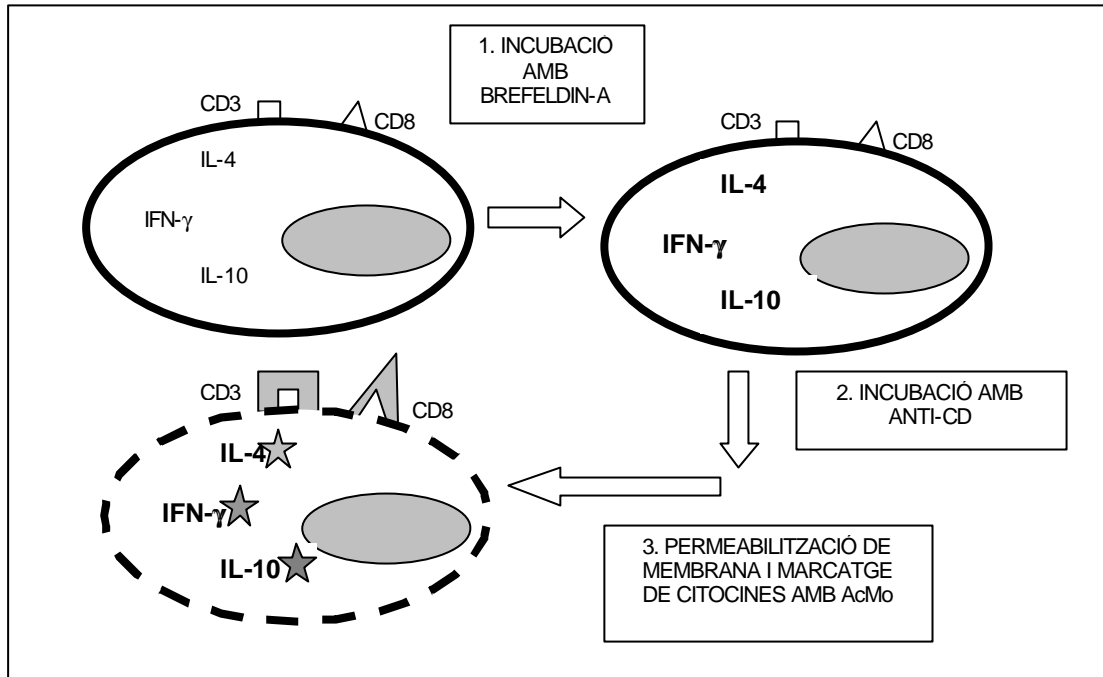


Figura 32. Esquema de la tècnica de detecció de citocines intracel·lulars

1) Per afavorir l'acumulació intracitoplasmàtica de citocines, s'incubaven les CMN amb Brefeldin-A; 2) Mitjançant AcMo conjugats amb fluorocroms es marcaven el CD3 i el CD8 de superfície; 3) Permeabilització de la membrana cel·lular amb Saponina i marcatge de les citocines amb AcMo conjugats amb fluorocroms.

3.3.4.3.8.3 Anàlisi citomètrica

Les cèl·lules marcades amb els AcMo, s'adquirien en un citòmetre i els citogrames resultants eren arxivats amb un programa informàtic per poder analitzarlos posteriorment. De cada mostra, s'adquirien dins la finestra seleccionada un total de 4000 cèl·lules.

Per avaluar l'activació cel·lular, se seleccionava una finestra corresponent a la població limfocitària, amb els paràmetres FSC i SSC (dispersió anterior i lateral) en els eixos X i Y respectivament. Posteriorment en aquesta població es seleccionaven les cèl·lules CD3 positives, i es determinava la proporció que expressava CD69, com a marcador d'activació. Es considerava una activació correcta si el percentatge

de cèl·lules CD3+ que expressava CD69 era superior al 80%, respecte a un control no activat.

Per avaluar el percentatge de cèl·lules que expressaven una determinada citocina (IL-4, IFN- γ , IL-10), la tècnica consistia en seleccionar els limfòcits amb els paràmetres FSC i SSC, i es guardava en un nou fitxer. A partir d'aquest, s'acotaven les cèl·lules CD3-perCP positives, en un citograma amb els eixos corresponents al SSC i al perCP. Posteriorment es creava un nou citograma amb els paràmetres CD8 i la citocina que es volia analitzar (IL-4, IFN- γ , IL-10), i es determinava per tant el percentatge de cèl·lules CD3+/CD8+ o CD3+/CD8- (presumiblement CD4+) que expressaven la citocina. No es podien marcar directament les cèl·lules CD4+ ja que es va comprovar que la tècnica d'estimulació amb PMA i ionomicina no permetia detectar cèl·lules marcades amb l'AcMo anti-CD4.

3.3.4.3.9 Cultius cel·lulars

Es van efectuar en tots els pacients al·lèrgics a *D pteronyssinus*.

En condicions estèrils, es varen preparar cultius en plaques de 24 pous, a una concentració de 0.5×10^6 cèl·lules (2500 μ l per pou). Per a cada mostra es varen realitzar tres cultius:

- sense antigen (com a control negatiu)
- amb *D. Pteronyssinus* a una concentració de 0.5 μ g/ml (concentració òptima determinada prèviament mitjançant estudi de dosis/resposta en assajos de proliferació).
- amb toxoide tetànic, a una concentració de 0.01 U/ml, com a antígen control (concentració òptima determinada prèviament mitjançant estudis de

dosis/resposta en assajos de proliferació).

Aquests cultius es van incubar en una estufa a 37°C en una atmosfera saturada d'aigua amb 5% de CO₂.

3.3.4.3.9.1 Assajos de proliferació limfocitària

Després de 5 dies de cultiu, 200 µL de suspensió cel·lular se traspassava per triplicat a plaques de 96 pous (200 µl per pou), afegint-se als mateixos 1 µCi de timidina tritiada 18 hores abans del final del cultiu. Al final del cultiu, les cèl·lules es recollien en filtres de fibra de vidre mitjançant un recolector de cèl·lules (Harvester Titertek). Aquests filtres, un cop secs, es col·locaven en tubs als quals s'afegia líquid d'espurneig. La proliferació limfocitària es determinava en funció de la timidina tritiada incorporada al nucli cel·lular. Aquesta incorporació es mesurava mitjançant espectrometria de centelleig líquid en una comptadora beta. La resta de suspensió cel·lular es mantenia en cultiu.

Per calcular l'índex d'estimulació (IE), els comptes per minut detectats en els cultius amb antigen era dividit per els comptes per minut dels cultius no estimulats.

3.3.4.3.9.2 Reestimulació i detecció de citocines

L'antigen induïx l'estimulació antigènica de poques clones cel·lulars i per tant el percentatge de cèl·lules que expressa una determinada citocina es baix, especialment en el cas de la IL-4. Amb la finalitat d'ampliar aquesta resposta, es van reestimar de forma inespecífica els cultius que havien estat preactivats amb l'antigen, basant-nos en una modificació dels mètodes usat per Kurtzhals²⁶⁹, Jutel²⁷⁰ i per Movérare²⁷¹. Així, es realitzà en aquells cultius amb antigen que presentaven un índex d'estimulació (IE) superior a 2.

La reestimulació es realitzava amb PMA i Ionomicina, segons el protocol que es

referí per a la determinació de la producció inespecífica de citocines (veure apartat 3.3.4.3.8), mantenint la concentració cel·lular de 0.5×10^6 cèl·lules. En resum, es procedia a la estimulació amb PMA i Ionomicina durant 4 hores, i després d'inhibir el transport intracel·lular amb Brefeldin-A, es marcaven el CD3 i el CD8 de superfície amb anticossos monoclonals conjugats amb fluorocroms, es permeabilitzava la membrana amb Saponina i es marcaven les citocines intracel·lulars IL-4, IL-10 i IFN- γ també amb AcMo marcats amb fluorocroms.

L'anàlisi es realitzava mitjançant citometria de flux, tal com es descriu a l'apartat 3.3.4.3.8.3.

3.3.5 ANÀLISI ESTADÍSTICA

Es va crear una base de dades mitjançant el paquet estadístic SPSS 9.0, que contenia 329 variables. L'anàlisi estadística es va fer amb aquest programa efectuant els següents càlculs:

- Anàlisi descriptiva: mitjanes i desviacions estàndard.
- Mitjançant el test de Kolmogorov-Smirnov es va estudiar si les mostres s'ajustaven a una distribució normal.
- Les variables qualitatives es varen analitzar amb la prova de la distribució Xi-Quadrat o la prova de la probabilitat exacta de Fisher si alguna de les freqüències esperades era inferior a 3.
- Per a variables quantitatives que mostraven una distribució normal es va utilitzar la prova de la T de Student de comparació de mitjanes per a mostres aparellades o independents. Si no mostraven una distribució normal, s'aplicaven proves no paramètriques com la prova de Mann-

Whitney per variables independents o la de Wilcoxon per variables dependents.

- Les correlacions entre variables es van mesurar mitjançant el coeficient de correlació simple de Pearson.

3.3.6 OBTENCIÓ DE REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

Les recerques bibliogràfiques van ser obtingudes mitjançant l'utilització de paraules clau a la base de dades Medline, a la pàgina web de la National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>). També es van realitzar consultes a les bases de dades de revistes no indexades al Medline, com Alergia y Inmunologia Clínica i Allergy & Clinical Immunology International.